

Isoliertes Photoprotein mtClytin, sowie dessen Verwendung

Die Erfindung betrifft das Photoprotein mtClytin, dessen Nukleotid- und Aminosäuresequenz, sowie die Aktivität und Verwendung des Photoproteins mtClytin.

Photoproteine

- 5 Als Biolumineszenz bezeichnet man das Phänomen der Lichterzeugung durch Lebewesen. Sie ist das Ergebnis von biochemischen Reaktionen in Zellen, bei denen die chemische Energie in Form von Lichtquanten abgegeben wird (sog. kalte Emission durch Chemolumineszenz). Derartig erzeugtes Licht ist monochromatisch, denn es wird bei einem diskreten Elektronen-Übergang abgestrahlt, kann aber durch sekundäre Leuchtfarbstoffe (z.B. fluoreszierende Proteine bei
- 10 Leuchtquallen der Gattung Aequora) in längerwellige Spektralbereiche verschoben werden.

- Die biologische Funktion ist vielfältig: In der Meerestiefe zwischen 200 und 1000 m (Mesopelagial) leuchten rund 90 % aller Lebewesen. Die Leuchtsignale werden hier zur Partnerwerbung, Täuschung und als Köder eingesetzt. Auch Glühwürmchen und Leuchtkäfer nutzen die Lichtsignale zur Partnersuche. Die Bedeutung des Leuchtens von Bakterien, Pilzen und
- 15 einzelligen Algen ist dagegen unklar. Es wird vermutet, dass es zur Koordination von vielen Einzel-Individuen einer großen Population eingesetzt wird oder eine Art biologische Uhr darstellt.

- Eine Vielzahl an Coelenteraten ist biolumineszent (Morin et al., 1974). Diese Organismen emittieren blaues oder grünes Licht. Das 1962 als erstes Licht produzierendes Protein identifizierte Aequorin aus Aequoria victoria (Shimomura et al., 1969) emittierte als isoliertes Protein ein blaues
- 20 Licht und nicht grünes Licht wie phänotypisch beobachtet bei Aequoria victoria. Später konnte das grün fluoreszierende Protein (GFP) aus Aequoria victoria isoliert werden, das aufgrund der Anregung durch das Aequorin die Meduse phänotypisch grün erscheinen lässt (Johnson et al., 1962; Hastings et al., 1969; Inouye et al., 1994). Als weitere Photoproteine konnten noch Clytin (Inouye et al., 1993), Mitrocomin (Fagan et al., 1993) und Obelin (Illarionov et al., 1995)
- 25 identifiziert und beschrieben werden.

Tabelle 1: Übersicht über einige Photoproteine. Angegeben sind der Name, der Organismus aus dem das Protein isoliert worden ist und die Identifikationsnummer (Acc. No.) des Datenbankeintrages.

Name	Organismus	Identifikations Nr.
Obelin	Obelia geniculata	AAL86372
Clytin	Clytia gregaria	CAA49754
Aequorin	Aequorea macrodactyla	AAK02061
Aequorin	Aequorea parva	AAK02060
Mitrocomin	Mitrocoma cellularia	AAA29298
Pholasin	Pholas dactylus	AAM18085
?	Symplectoteuthis oualaniensis	AX305029

5 **Tabelle 2:** Übersicht über einige Photoproteine. Angegeben sind der Organismus aus dem das Protein isoliert worden ist, der Name des Photoproteins und eine Auswahl an Patenten bzw. Anmeldungen.

Organismus	Fluoreszierendes Protein	Patent / Anmeldung
Obelia geniculata	Obelin	WO03006497
Clytia gregaria	Clytin	WO03006497
Aequoria victoria	Aequorin	WO200168824 US-0908909 US 6,152,358 JP-0176125
Pholas dactylus	Pholasin	WO0028025 GB-0024357

10 Biolumineszenz wird heute in der Technik vielfältig genutzt, z.B. in Form von Bio-Indikatoren für Umweltverschmutzung oder in der Biochemie zum empfindlichen Nachweis von Proteinen, zur Quantifizierung bestimmter Verbindungen oder als sogenannte "Reporter" bei der Untersuchung zellulärer Gen-Regulation.

Die Photoproteine unterscheiden sich nicht nur aufgrund ihrer Nukleotid- und Aminosäuresequenz, sondern auch aufgrund ihrer biochemischen und physikalischen Eigenschaften.

Es konnte gezeigt werden, dass durch die Veränderung der Aminosäuresequenz von Photoproteinen die physikalischen und biochemischen Eigenschaften verändert werden können. Beispiele von mutagenisierten Photoproteinen sind in der Literatur beschrieben (US 6,495,355; US 5,541,309; US 5,093,240; Shimomura et al., 1986).

- 5 Die Lichterzeugung durch die oben genannten Photoproteine erfolgt durch die Oxidation von Coelenterazin (Haddock et al., 2001; Jones et al., 1999).

Reportersysteme

Als Reporter- oder Indikatorgen bezeichnet man generell Gene, deren Genprodukte sich mit Hilfe einfacher biochemischer oder histochemischer Methoden leicht nachweisen lassen. Man unter-
10 scheidet mindestens 2 Typen von Reportergenen.

1. Resistenzgene. Als Resistenzgene werden Gene bezeichnet, deren Expression einer Zelle die Resistenz gegen Antibiotika oder andere Substanzen verleiht, deren Anwesenheit im Wachstumsmedium zum Zelltod führt, wenn das Resistenzgen fehlt.
2. Reportergene. Die Produkte von Reportergenen werden in der Gentechnologie als
15 fusionierte oder unfusionierte Indikatoren verwendet. Zu den gebräuchlichsten Reportergenen gehören die beta-Galaktosidase (Alam et al., 1990), alkalische Phosphatase (Yang et al., 1997; Cullen et al., 1992), Luciferasen und andere Photoproteine (Shinomura, 1985; Phillips GN, 1997; Snowdowne et al., 1984).

Als Lumineszenz bezeichnet man die Abstrahlung von Photonen im sichtbaren Spektralbereich,
20 wobei diese durch angeregte Emittiermoleküle erfolgt. Im Unterschied zur Fluoreszenz wird hierbei die Energie nicht von Außen in Form von Strahlung kürzerer Wellenlänge zugeführt.

Man unterscheidet Chemolumineszenz und Biolumineszenz. Als Chemolumineszenz bezeichnet man eine chemische Reaktion, die zu einem angeregten Molekül führt, das selbst leuchtet, wenn die angeregten Elektronen in den Grundzustand zurückkehren. Wird diese Reaktion durch ein
25 Enzym katalysiert, spricht man von Biolumineszenz. Die an der Reaktion beteiligten Enzyme werden generell als Luziferasen bezeichnet.

Einordnung der Spezies *Clytia gregaria*

Cnidaria → Leptomedusae → Campanulariidae → *Clytia gregaria*

Die Spezies *Clytia gregaria* gehört zu den Cnidaria, speziell zu den Medusen. Der biolumineszente
30 bzw. fluoreszente Phänotyp wurde bereits 1998 beschrieben (Ward et al., 1998).

Isolierung der cDNA

Zur Untersuchung der Biolumineszenz-Aktivität der Spezies *Clytia gregaria* wurden Exemplare im Weißen Meer (Biologische Station Kartesh, Russland) gefangen und in flüssigem Stickstoff gelagert. Zur Erstellung der cDNA-Bibliotheken von *Clytia gregaria*, wurde die poly(a)+ RNA mit Hilfe des „Straight A“ Isolationsmethode von Novagen (USA) isoliert.

Zur Herstellung der cDNA wurde eine RT-PCR durchgeführt. Hierzu wurden 1 µg RNA mit Reverser Transkriptase (Superscript Gold II) nach folgendem Schema inkubiert:

10	PCR	1.	30	Sekunden	95°C
		2.	6	Minuten	68°C
		3.	10	Sekunden	95°C
		4.	6	Minuten	68°C
17 Zyklen von Schritt 4 nach Schritt 3					

Die Reaktionsprodukte wurden zur Inaktivierung der Polymerase für 30 Minuten bei 37°C mit Proteinase K inkubiert und die cDNA mit Ethanol präzipitiert. Die Expression-cDNA Bank wurde mit Hilfe des „SMART cDNA Library Construction Kits“ der Firma Clontech (USA) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Klonierung erfolgte in den Expressionsvektor pTriplEx2 (Clontech; USA). Die Expressionsvektoren wurden durch Elektroporation in Bakterien des Stammes *E. coli* XL1-Blue transformiert.

Die Bakterien wurden auf LB-Nährböden plattiert und für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde eine Replikaplattierung durchgeführt, indem die Bakterien mit Hilfe eines Nitrocellulosefilters auf eine weitere Nährbodenplatte übertragen wurden. Die Replikaplatte wurde wiederum für 24 Stunden bei 37°C inkubiert und die gewachsenen Bakterienkolonien in LB-Flüssigmedium übertragen. Nach der Zugabe von IPTG (Endkonzentration 0,1 mM) wurden die Bakterien für 4 Stunden bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation geerntet und die Bakterienmasse in 0,5 ml Aufschlusspuffer (5 mM EDTA, 20 mM Tris-HCL pH 9,0) bei 0°C resuspendiert. Anschließend erfolgte der Aufschluss der Bakterien durch Ultraschall.

Die Lysate wurden nach der Zugabe von Coelenterazine (Endkonzentration 10E-07 M) bei 4°C für 3 Stunden inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung der Biolumineszenz nach der Zugabe von Calciumchlorid (Endkonzentration 20 mM) im Luminometer.

Es wurde ein Photoprotein identifiziert. Das Photoprotein wurde als mtClytin bezeichnet. Im Folgenden wird das Photoprotein mtClytin im einzelnen dargestellt.

Das Photoprotein mtClytin zeigt die höchste Homologie auf Aminosäureebene zu Clytin aus Clytia gregaria mit einer Identität von 87 % und zu Obelin aus Obelia geniculata eine Identität von 77 % (gezeigt in Beispiel 8; Figur 8). Die Homologie von 87 % - in Bezug auf Clytin - ergibt sich am C-terminalen Ende des Proteins, wobei verteilt über das gesamte Protein mehrfache Aminosäureaustausche zu identifizieren sind. Auf Nukleinsäureebene liegt die Identität unter 30 % (gezeigt in Beispiel 7; Figur 7). Zum Sequenzvergleich wurde das BLAST-Verfahren verwendet (Altschul et al., 1997).

Das Photoprotein Clytin-2 zeigt die höchste Homologie auf Aminosäureebene zu Clytin aus Clytia gregaria. Die Sequenz weist jedoch eine Reihe an Abweichungen in der Aminosäuresequenz auf, die im Beispiel 11 (Figur 9) dargestellt sind. Diese Abweichungen können zur veränderten physikochemischen, biochemischen und biolumineszenten Eigenschaften führen. Das Photoprotein Clytin-2 besitzt kein Signalpeptid (wie in Beispiel 10 gezeigt).

Das Photoprotein mtClytin besitzt ein Signalpeptid, das zur Translokation des Photoproteins in Mitochondrien führen kann. Die Identifizierung des Signalpeptides erfolgte durch das Computerprogramm MITOPROT (Claros et al., 1996) (gezeigt in Beispiel 10). Das durch MITOPROT ermittelte Signalpeptid ist in SEQ ID NO: 3 angegeben. Das Photoprotein mtClytin ist das erste Photoprotein, bei dem ein natürliches Signalpeptid zur Translokation in Mitochondrien identifiziert werden konnte.

Die Erfindung betrifft auch funktionelle Äquivalente von mtClytin. Funktionelle Äquivalente sind solche Proteine, die vergleichbare physikochemische Eigenschaften haben und mindestens 70 % homolog sind zu SEQ ID NO: 2. Bevorzugt ist eine Homologie von mindestens 80 % oder 90 %. Besonders bevorzugt ist eine Homologie von mindestens 95 %.

Die Erfindung betrifft auch die funktionellen Äquivalente des Signalpeptides von mtClytin. Funktionelle Äquivalente sind solche Proteine oder Peptide, die vergleichbare physikochemische Eigenschaften haben und mindestens 70 % homolog sind zu SEQ ID NO: 3. Bevorzugt ist eine Homologie von mindestens 80 % oder 90 %. Besonders bevorzugt ist eine Homologie von mindestens 95 %.

Das Photoprotein mtClytin eignet sich als Reportergen für zelluläre Systeme speziell für Rezeptoren, für Ionenkanäle, für Transporter, für Transkriptionsfaktoren oder für induzierbare Systeme.

Das Signalpeptid von mtClytin eignet sich auch als Fusion mit Reportergen als fusionierte Reportergen für zelluläre Systeme speziell für Rezeptoren, für Ionenkanäle, für Transporter, für Transkriptionsfaktoren oder für induzierbare Systeme.

5 Das Photoprotein mtClytin eignet sich auch als Reportergen durch Markierung, Identifizierung und Charakterisierung von Zellorganellen speziell für Mitochondrien.

Das Signalpeptid von mtClytin eignet sich auch zur Fusion mit Peptiden oder Proteinen zur Translokation in Zellorganellen speziell Mitochondrien.

10 Das Photoprotein von mtClytin eignet sich auch als Reportergen zur Bestimmung von Parametern innerhalb und außerhalb von Zellorganellen, speziell von Mitochondrien, speziell von Kalziumkonzentrationen.

Das Signalpeptid von mtClytin eignet sich als Fusionspeptid auch als Reportergen zur Bestimmung von Parametern innerhalb und außerhalb von Zellorganellen, speziell von Mitochondrien, speziell von Kalziumkonzentrationen.

15 Das Photoprotein mtClytin eignet sich als Reportergen in bakteriellen und eukaryotischen Systemen speziell in Säugerzellen, in Bakterien, in Hefen, in Bakulo, in Pflanzen.

Das Photoprotein mtClytin eignet sich als Reportergen für zelluläre Systeme in Kombination mit biolumineszenten oder chemolumineszenten Systemen, speziell Systemen mit Luziferasen, mit Oxygenasen, mit Phosphatasen.

20 Das Signalpeptid von mtClytin eignet sich als Fusionspeptid auch als Reportergen für zelluläre Systeme in Kombination mit biolumineszenten oder chemolumineszenten Systemen, speziell Systemen mit Luziferasen, mit Oxygenasen, mit Phosphatasen.

Das Photoprotein mtClytin eignet sich als Fusionsprotein speziell für Rezeptoren, für Ionenkanäle, für Transporter, für Transkriptionsfaktoren, für Proteinasen, für Kinasen, für Phosphodiesterasen, für Hydrolasen, für Peptidasen, für Transferasen, für Membranproteine und für Glykoproteine.

25 Das Signalpeptid von mtClytin eignet sich als Fusionspeptid auch als Fusionsprotein speziell für Rezeptoren, für Ionenkanäle, für Transporter, für Transkriptionsfaktoren, für Proteinasen, für Kinasen, für Phosphodiesterasen, für Hydrolasen, für Peptidasen, für Transferasen, für Membranproteine und für Glykoproteine.

30 Das Photoprotein mtClytin eignet sich zur Immobilisierung speziell durch Antikörper, durch Biotin, durch magnetische oder magnetisierbare Träger.

Das Photoprotein mtClytin eignet sich als Protein für Systeme des Energietransfers speziell der FRET- (Fluorescence Resonance Energy Transfer), BRET- (Bioluminescence Resonance Energy Transfer), FET (field effect transistors), FP (fluorescence polarization), HTRF (Homogeneous time-resolved fluorescence) Systemen.

- 5 Das Photoprotein mtClytin eignet sich als Markierung von Substraten oder Liganden speziell für Proteasen, für Kinasen, für Transferasen.

Das Photoprotein mtClytin eignet sich zur Expression in bakteriellen Systemen speziell zur Titerbestimmung, als Substrat für biochemische Systeme speziell für Proteinasen und Kinasen.

- 10 Das Photoprotein mtClytin eignet sich als Marker speziell gekoppelt an Antikörper, gekoppelt an Enzyme, gekoppelt an Rezeptoren, gekoppelt an Ionenkanäle und andere Proteine.

Das Signalpeptid von mtClytin eignet sich als Fusionspeptid auch als Marker speziell gekoppelt an Antikörper, gekoppelt an Enzyme, gekoppelt an Rezeptoren, gekoppelt an Ionenkanäle und andere Proteine.

- 15 Das Photoprotein mtClytin eignet sich als Reportergen bei der pharmakologischen Wirkstoffsuche speziell im HTS (High Throughput Screening).

Das Signalpeptid von mtClytin eignet auch als Reportergen bei der pharmakologischen Wirkstoffsuche speziell im HTS (High Throughput Screening).

- 20 Das Photoprotein mtClytin eignet sich als Komponente von Detektionssystemen speziell für ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), für Immunohistochemie, für Western-Blot, für die konfokale Mikroskopie.

Das Photoprotein mtClytin eignet sich als Marker für die Analyse von Wechselwirkungen speziell für Protein-Protein-Wechselwirkungen, für DNA-Protein-Wechselwirkungen, für DNA-RNA-Wechselwirkungen, für RNA-RNA-Wechselwirkungen, für RNA-Protein-Wechselwirkungen (DNA: deoxyribonucleic acid; RNA: ribonucleic acid;).

- 25 Das Photoprotein mtClytin eignet sich als Marker oder Fusionsprotein für die Expression in transgenen Organismen speziell in Mäusen, in Ratten, in Hamstern und anderen Säugetieren, in Primaten, in Fischen, in Würmern, in Pflanzen.

- 30 Das Signalpeptid von mtClytin eignet sich als Fusionspeptid auch als Marker oder Fusionsprotein für die Expression in transgenen Organismen speziell in Mäusen, in Ratten, in Hamstern und anderen Säugetieren, in Primaten, in Fischen, in Würmern, in Pflanzen.

Das Photoprotein mtClytin eignet sich als Marker oder Fusionsprotein zur Analyse der Embryonalentwicklung.

Das Photoprotein mtClytin eignet sich als Marker über einen Kopplungsvermittler speziell über Biotin, über NHS (N-hydroxysulfosuccimide), über CN-Br.

- 5 Das Photoprotein mtClytin eignet sich als Reporter gekoppelt an Nukleinsäuren speziell an DNA, an RNA.

Das Photoprotein mtClytin eignet sich als Reporter gekoppelt an Proteine oder Peptide.

Das Signalpeptid von mtClytin eignet sich als Fusionspeptid auch als Reporter gekoppelt an Proteine oder Peptide.

- 10 Das Photoprotein mtClytin eignet sich als Reporter zur Messung von intra- oder extrazellulären Calciumkonzentrationen.

Das Photoprotein mtClytin eignet sich zur Charakterisierung von Signalkaskaden in zellulären Systemen.

- 15 Das an Nukleinsäuren oder Peptiden gekoppelte Photoprotein mtClytin eignet sich als Sonde speziell für Northern-Blots, für Southern-Blots, für Western-Blots, für ELISA, für Nukleinsäuresequenzierungen, für Proteinanalysen, Chip-Analysen.

Das Photoprotein mtClytin eignet sich zur Markierung von pharmakologischen Formulierungen speziell von infektiösen Agentien, von Antikörpern, von „small molecules“.

- 20 Das Photoprotein mtClytin eignet sich für geologische Untersuchungen speziell für Meeres-, Grundwasser- und Flusströmungen.

Das Photoprotein mtClytin eignet sich zur Expression in Expressionssystemen speziell in in-vitro Translationssystemen, in bakteriellen Systemen, in Hefe Systemen, in Bakulo Systemen, in viralen Systemen, in eukaryotischen Systemen.

- 25 Das Signalpeptid von mtClytin eignet sich als Fusionspeptid auch zur Expression in Expressionssystemen speziell in in-vitro Translationssystemen, in bakteriellen Systemen, in Hefe Systemen, in Bakulo Systemen, in viralen Systemen, in eukaryotischen Systemen.

Das Photoprotein mtClytin eignet sich zur Visualisierung von Geweben oder Zellen bei chirurgischen Eingriffen speziell bei invasiven, bei nicht-invasiven, bei minimal-invasiven.

Das Photoprotein mtClytin eignet sich auch zur Markierung von Tumorgeweben und anderen phänotypisch veränderten Geweben speziell bei der histologischen Untersuchung, bei operativen Eingriffen.

Die Erfindung betrifft auch die Reinigung des Photoprotein mtClytin speziell als wildtyp Protein,
5 als Fusionsprotein, als mutagenisiertes Protein.

Die Erfindung betrifft auch die Reinigung des Signalpeptides von mtClytin speziell als wildtyp Protein, als Fusionsprotein, als mutagenisiertes Protein.

Die Erfindung betrifft auch die Verwendung des Photoprotein mtClytin auf dem Gebiet der Kosmetik speziell von Badezusätzen, von Lotionen, von Seifen, von Körperfarben, von
10 Zahncreme, von Körperpudern.

Die Erfindung betrifft auch die Verwendung des Photoprotein mtClytin zur Färbung speziell von Nahrungsmitteln, von Badezusätzen, von Tinte, von Textilien, von Kunststoffen.

Die Erfindung betrifft auch die Verwendung des Photoprotein mtClytin zur Färbung von Papier speziell von Grußkarten, von Papierprodukten, von Tapeten, von Bastelartikeln.

15 Die Erfindung betrifft auch die Verwendung des Photoprotein mtClytin zur Färbung von Flüssigkeiten speziell für Wasserpistolen, für Springbrunnen, für Getränke, für Eis.

Die Erfindung betrifft auch die Verwendung des Photoprotein mtClytin zur Herstellung von Spielwaren speziell von Fingerfarbe, von Schminke.

Die Erfindung betrifft Nukleinsäuremoleküle, die das Polypeptid offenbart durch SEQ ID NO: 2
20 kodieren.

Die Erfindung betrifft Nukleinsäuremoleküle, die das Polypeptid offenbart durch SEQ ID NO: 3 kodieren.

Die Erfindung betrifft Nukleinsäuremoleküle, die das Polypeptid offenbart durch SEQ ID NO: 6 kodieren.

25 Die Erfindung betrifft das Polypeptid mit der Aminosäuresequenz, die in SEQ ID NO: 2 offenbart ist.

Die Erfindung betrifft das Polypeptid mit der Aminosäuresequenz, die in SEQ ID NO: 3 offenbart ist.

Die Erfindung betrifft das Polypeptid mit der Aminosäuresequenz, die in SEQ ID NO: 6 offenbart ist.

Die Erfindung bezieht sich des weiteren auf Nukleinsäuremoleküle, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus

- 5 a) Nukleinsäuremolekülen, die ein Polypeptid kodieren, welches die Aminosäuresequenz offenbart durch SEQ ID NO: 2 beinhaltet;
- b) Nukleinsäuremolekülen, welche die durch SEQ ID NO: 1 dargestellte Sequenz enthalten;
- c) Nukleinsäuremolekülen, deren komplementärer Strang mit einem Nukleinsäuremolekül aus a) oder b) unter stringenten Bedingungen hybridisiert und welche ein Polypeptid
10 kodieren, das die biologische Funktion eines Photoproteins aufweist;

Eine stringente Hybridisierung von Nukleinsäuremolekülen kann zum Beispiel in einer wässrigen Lösung, die 0,2 x SSC (1x standard saline-citrate = 150 mM NaCl, 15 mM Trinatriumcitrat) enthält, bei 68°C durchgeführt werden (Sambrook et al., 1989).

- d) Nukleinsäuremolekülen, welche sich auf Grund der Degenerierung des genetischen Kodes
15 von den unter c) genannten unterscheiden;
- e) Nukleinsäuremolekülen, welche eine Sequenzhomologie von mindestens 95 % zu SEQ ID NO: 1 zeigen, und deren Proteinprodukt die biologische Funktion eines Photoproteins aufweist; und
- f) Nukleinsäuremolekülen, welche eine Sequenzhomologie von mindestens 65 % zu SEQ ID
20 NO: 1 zeigen, und deren Proteinprodukt die biologische Funktion eines Photoproteins aufweist.

Die Erfindung betrifft auch Nukleinsäuremoleküle, die eine Sequenzhomologie von mindestens 95 %, 90 %, 85 %, 80 %, 75 %, 70 %, 65 % oder 60 % zu SEQ ID NO: 1 oder SEQ ID NO: 5 aufweisen und für ein Polypeptid kodieren, welches die Eigenschaften eines Photoproteins besitzt.

- 25 Die Erfindung betrifft auch Nukleinsäuremoleküle, die eine Sequenzhomologie von mindestens 95 %, 90 %, 85 %, 80 %, 75 %, 70 %, 65 % oder 60 % zu SEQ ID NO: 4 aufweisen und für ein Polypeptid kodieren, welches die Eigenschaften eines Signal- bzw. Leaderpeptides besitzt.

Die Erfindung betrifft die oben genannten Nukleinsäuremoleküle, bei denen die Sequenz einen funktionalen Promotor 5' zu der das Photoprotein kodierenden Sequenz bzw. der das Leader- oder Siganlsequenz kodierenden Sequenz enthält.

Die Erfindung betrifft auch Nukleinsäuremoleküle wie vorhergehend beschrieben, die Bestandteil
5 von rekombinanten DNA oder RNA Vektoren sind.

Die Erfindung betrifft Organismen, die einen solchen Vektor enthalten.

Die Erfindung bezieht sich auf Oligonukleotide mit mehr als 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden, die identisch oder komplementär zur DNA oder RNA Sequenz der mtClytin Moleküle oder der weiteren erfindungsgemäßen Molekülen sind.

10 Die Erfindung betrifft Photoproteine, die durch die vorhergehend beschriebenen Nukleotidsequenzen kodiert sind.

Die Erfindung bezieht sich auf Verfahren zur Expression der erfindungsgemäßen Photoprotein Polypeptide in Bakterien, eukaryontischen Zellen oder in *in vitro* Expressionssystemen.

Die Erfindung betrifft auch Verfahren zur Aufreinigung/Isolierung eines erfindungsgemäßen
15 Photoprotein Polypeptides.

Die Erfindung bezieht sich auf Peptide mit mehr als 5 aufeinanderfolgenden Aminosäuren, die immunologisch durch Antikörper gegen die erfindungsgemäßen Photoproteine erkannt werden.

Die Erfindung betrifft die Verwendung der erfindungsgemäßen, für Photoproteine kodierende Nukleinsäuren als Marker- oder Reportergene, insbesondere für die pharmakologische Wirkstoff-
20 suche und Diagnostik.

Die Erfindung betrifft die Verwendung der erfindungsgemäßen Photoproteine bzw. eine erfindungsgemäße, für ein Photoprotein kodierende Nukleinsäure als Marker oder Reporter bzw. als Marker- oder Reportergen.

Die Erfindung betrifft die Verwendung des Photoproteins mtClytin (SEQ ID NO: 2) bzw. die
25 Verwendung einer für das Photoprotein mtClytin kodierenden Nukleinsäure als Marker oder Reporter bzw. als Marker oder Reportergen insbesondere für die pharmakologische Wirkstoffsuche und Diagnostik.

Die Erfindung betrifft die Verwendung der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Nukleinsäure als Marker- oder Reportergen, insbesondere für die pharmakologische Wirkstoffsuche und Diagnostik.

Die Erfindung betrifft die Verwendung des in SEQ ID NO: 6 dargestellten Peptides und der hierzu zugrundeliegenden Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO: 5 als Marker- oder Reportergen, insbesondere für die pharmakologische Wirkstoffsuche und Diagnostik.

5 Gegenstand der Erfindung sind auch polyklonale oder monoklonale Antikörper, welche ein erfindungsgemäßes Polypeptid erkennen.

Die Erfindung betrifft auch monoklonale oder polyklonale Antikörper, die das Photoprotein mtClytin (SEQ ID NO:2) bzw. das Photoprotein Clytin-2 (SEQ ID NO: 6) erkennen.

Die Erfindung betrifft auch monoklonale oder polyklonale Antikörper, die das Signalpeptide des Photoprotein mtClytin (SEQ ID NO: 3) erkennen.

10 Des weiteren betrifft die Erfindung ein Nukleinsäuremolekül, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus

- a) Nukleinsäuremolekülen, die ein Polypeptid kodieren, welches die Aminosäuresequenz offenbart durch SEQ ID NO: 3 beinhaltet;
 - b) Nukleinsäuremolekülen, welche die in SEQ ID NO: 4 dargestellte Sequenz beinhaltet;
 - 15 c) Nukleinsäuremolekülen, deren komplementärer Strang mit einem Nukleinsäuremolekül aus a) oder b) unter stringenten Bedingungen hybridisiert und welche ein Peptid kodieren, das die biologische Funktion eines Signal- oder Leaderpeptides aufweist;
 - d) Nukleinsäuremolekülen, welche sich auf Grund der Degenerierung des genetischen Kodes von den unter c) genannten unterscheiden;
 - 20 e) Nukleinsäuremolekülen, welche eine Sequenzhomologie von mindestens 95 % zu SEQ ID NO: 4 zeigen, und welche ein Peptid kodieren, das die biologische Funktion eines Signal- oder Leaderpeptides aufweist; und
 - f) Nukleinsäuremolekülen, welche eine Sequenzhomologie von mindestens 65 % zu SEQ ID NO: 4 zeigen, und welche ein Peptid kodieren, das die biologische Funktion eines Signal- oder Leaderpeptides aufweist.
- 25

Ebenfalls Bestandteil der Erfindung ist ein Nukleinsäuremolekül, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus

- a) Nukleinsäuremolekülen, die ein Polypeptid kodieren, welches die Aminosäuresequenz offenbart durch SEQ ID NO: 6 beinhaltet;

- b) Nukleinsäuremolekülen, welche die in SEQ ID NO: 5 dargestellte Sequenz beinhaltet;
- c) Nukleinsäuremolekülen, deren komplementärer Strang mit einem Nukleinsäuremolekül aus a) oder b) unter stringenten Bedingungen hybridisiert und welche ein Polypeptid kodieren, das die biologische Funktion eines Photoproteins aufweist;
- 5 d) Nukleinsäuremolekülen, welche sich auf Grund der Degenerierung des genetischen Kodes von den unter c) genannten unterscheiden;
- e) Nukleinsäuremolekülen, welche eine Sequenzhomologie von mindestens 95 % zu SEQ ID NO: 5 zeigen, und welche ein Polypeptid kodieren, das die biologische Funktion eines Photoproteins aufweist; und
- 10 f) Nukleinsäuremolekülen, welche eine Sequenzhomologie von mindestens 80 % zu SEQ ID NO: 5 zeigen, und welche ein Polypeptid kodieren, das die biologische Funktion eines Photoproteins aufweist.

Die Erfindung betrifft auch eine Nukleinsäure wie in den vorangehenden Absätzen beschrieben, welche einen funktionalen Promotor 5' zur kodierenden Sequenz enthält.

- 15 Die Erfindung beinhaltet rekombinante DNA oder RNA Vektoren, welche die vorangehend beschriebenen Nukleinsäuren enthalten.

Organismen, die einen wie vorangehend beschriebenen Vektor enthalten, sind ebenfalls erfindungsgemäß.

- 20 Die Erfindung bezieht sich auch auf Oligonukleotide mit mehr als 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden, die identisch oder komplementär zu einer Teilsequenz eines wie oben beschrieben Nukleinsäuremoleküls sind.

Ein Polypeptid, das durch eine wie oben beschriebene Nukleinsäuresequenz kodiert ist, ist ebenfalls Teil der Erfindung.

- 25 Erfindungsgemäß ist auch ein Verfahren zur Expression der vorangehend genannten Polypeptide in Bakterien, viralen Zellen, Hefen oder eukaryontischen Zellen oder in *in vitro* Expressionssystemen.

Bestandteil der Erfindung ist ebenfalls ein Verfahren zur Aufreinigung/Isolierung eines erfindungsgemäßen Polypeptides.

Erfindungsgemäß sind ebenfalls Peptide mit mehr als 5 aufeinanderfolgenden Aminosäuren, die immunologisch durch Antikörper gegen das Photoprotein mtClytin erkannt werden:

Bestandteil der Erfindung sind weiterhin Peptide mit mehr als 5 aufeinanderfolgenden Aminosäuren, die immunologisch durch Antikörper gegen das Photoprotein Clytin-2 erkannt werden.

- 5 Ebenfalls Bestandteil der Erfindung sind Peptide mit mehr als 5 aufeinanderfolgenden Aminosäuren, die immunologisch durch Antikörper gegen das durch SEQ ID NO: 3 offenbarte Signal- bzw. Leaderpeptid erkannt werden.

- Auch erfindungsgemäß sind Peptide mit mehr als 5 aufeinanderfolgenden Aminosäuren, die immunologisch durch Antikörper gegen das Photoprotein offenbart durch SEQ ID NO:6 (Clytin-2)
10 erkannt werden.

Die Erfindung betrifft die Verwendung einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure als Marker- oder Reportergen.

Die Erfindung betrifft auch die Verwendung eines erfindungsgemäßen Photoproteins als Marker oder Reporter.

- 15 Des weiteren betrifft die Erfindung die Verwendung einer Nukleinsäure, welche die als SEQ ID NO: 4 dargestellte Sequenz, bzw. eine Sequenz mit 60 %iger, 65 %iger, 70 %iger, 75 %iger, 80 %iger, 85 %iger oder 90 %iger, vorzugsweise mit 95 %iger Sequenzidentität zu SEQ ID NO: 4, beinhaltet, als Signal- bzw. Leadersequenz.

- Auch ist die Verwendung eines Peptides, welches die als SEQ ID NO: 3 dargestellte Sequenz,
20 bzw. eine Sequenz mit 60 %iger, 65 %iger, 70 %iger, 75 %iger, 80 %iger, 85 %iger oder 90 %iger, vorzugsweise mit 95 %iger Sequenzidentität zu SEQ ID NO: 3 beinhaltet, als Signal- bzw. Leaderpeptid Bestandteil der Erfindung.

- Ebenfalls Erfindungsgemäß ist die in den zwei vorangehenden Absätzen beschriebene Verwendung, um an das Signal- bzw. Leaderpeptid fusionierte Proteine in Zellorganellen zu
25 transportieren.

Bestandteil der Erfindung ist auch die im vorangehenden Absatz beschriebene Verwendung, wobei es sich bei den Zellorganellen um Mitochondrien handelt.

Bestandteil der Erfindung ist auch die im vorletzten Absatz beschriebene Verwendung, wobei es sich bei den Zellorganellen um das endoplasmatische Retikulum (ER) handelt.

Des weiteren betrifft die Erfindung die Verwendung der als SEQ ID NO: 4 dargestellten Nukleinsäuresequenz als Signal- bzw. Leadersequenz.

Auch ist die Verwendung des als SEQ ID NO: 3 dargestellten Peptides, welches die dargestellte Sequenz beinhaltet, als Signal- bzw. Leaderpeptid Bestandteil der Erfindung.

- 5 Ebenfalls Erfindungsgemäß ist die in den zwei vorangehenden Absätzen beschriebene Verwendung, um ein an das Signal- bzw. Leaderpeptid fusioniertes Protein in Zellorganellen zu transportieren.

Bestandteil der Erfindung ist auch die im vorangehenden Absatz beschriebene Verwendung, wobei es sich bei den Zellorganellen um Mitochondrien handelt.

- 10 Bestandteil der Erfindung ist auch die im vorletzten Absatz beschriebene Verwendung, wobei es sich bei den Zellorganellen um das endoplasmatische Retikulum (ER) handelt.

Die Verwendung der erfindungsgemäßen Polypeptide als Reporterproteine in der pharmakologischen Wirkstoffsuche ist ebenfalls Bestandteil der Erfindung.

- 15 Schließlich betrifft die Erfindung auch die Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren als Reportergene in der pharmakologischen Wirkstoffsuche.

Expression der erfindungsgemäßen Photoproteine

- Als Expression bezeichnet man die Produktion eines Moleküls, das nach dem Einbringen des Gens in eine geeignete Wirtszelle die Transcription und Translation des in einen Expressionsvektor klonierte Fremdgen erlaubt. Expressionsvektoren enthalten die für die Expression von Genen in
- 20 Zellen von Prokaryonten oder Eukaryonten erforderlichen Kontrollsignale.

Expressionsvektoren können prinzipiell auf zwei verschiedene Weisen konstruiert werden. Bei den sogenannten Transkriptionsfusionen wird das vom einklonierten Fremdgen codierte Protein als authentisches, biologisch aktives Protein synthetisiert. Der Expressionsvektor trägt hierzu alle zur Expression benötigten 5'- und 3'- Kontrollsignale.

- 25 Bei den sogenannten Translationsfusionen wird das vom einklonierten Fremdgen codierte Protein als Hybridprotein zusammen mit einem anderen Protein exprimiert, das sich leicht nachweisen lässt. Die zur Expression benötigten 5'- und 3'- Kontrollsignale inklusive des Startcodons und eventuell ein Teil der für die N-terminalen Bereiche des zu bildenden Hybridproteins codierenden Sequenzen stammen vom Vektor. Der zusätzliche eingeführte Proteinteil stabilisiert nicht nur in
- 30 vielen Fällen das vom einklonierten Fremdgen codierte Protein vor dem Abbau durch zelluläre

Proteasen, sondern lässt sich auch zum Nachweis und zur Isolierung des gebildeten Hybridproteins einsetzen. Die Expression kann sowohl transient, als auch stabil erfolgen. Als Wirtsorganismen eignen sich sowohl Bakterien, Hefen, Viren als auch eukaryotische Systeme.

Reinigung der erfindungsgemäßen Photoproteine

- 5 Die Isolierung von Proteinen (auch nach Überexpression) wird häufig als Proteinreinigung bezeichnet. Zur Proteinreinigung steht eine Vielzahl an etablierten Methoden und Verfahren zur Verfügung.

- Die Fest-Flüssig-Trennung ist eine Grundoperation bei Proteinisolierungen. Sowohl bei der Abtrennung der Zellen vom Kulturmedium als auch bei der Klärung des Rohextraktes nach
10 Zellaufschluss und Entfernung der Zelltrümmer, bei der Abtrennung von Niederschlägen nach Fällungen usw. ist der Verfahrensschritt erforderlich. Er erfolgt durch Zentrifugation und Filtration.

- Durch Gewinnung intrazellulärer Proteine muss die Zellwand zerstört bzw. durchlässig gemacht werden. Je nach Maßstab und Organismus werden dazu Hochdruckhomogenisatoren oder
15 Rührwerkskugel- bzw. Glasperlenmühlen eingesetzt. Im Labormaßstab kommen u.a. mechanische Zellintegrationen und Ultraschallbehandlung zum Einsatz.

- Sowohl für extrazelluläre als auch intrazelluläre Proteine (nach Zellaufschluss) sind verschiedene Fällungsverfahren mit Salzen (insbesondere Ammoniumsulfat) oder organischen Lösungsmitteln (Alkohole, Aceton) eine schnelle und effiziente Methode zur Konzentration von Proteinen. Bei der
20 Reinigung intrazellulärer Proteine ist die Entfernung der löslichen Nukleinsäuren erstrebenswert (Fällung z.B. mit Streptomycin- oder Protaminsulfat). Bei der Gewinnung extrazellulärer Proteine werden häufig Träger (z.B. Stärke, Kieselgur) vor Zugabe der Fällungsmittel zugesetzt, um besser handhabbare Niederschläge zu erhalten.

- Für die Feinreinigung stehen zahlreiche chromatographische und Verteilungsverfahren zur
25 Verfügung (Absorptions- und Ionenaustauschchromatographie, Gelfiltration, Affinitätschromatographie, Elektrophoresen). Eine Säulenchromatographie wird auch im technischen Maßstab angewandt. Für den Labormaßstab ist vor allem die Affinitätschromatographie von Bedeutung, die Reinigungsfaktoren bis zu mehreren 100 pro Schritt ermöglicht.

- Extrazelluläre Proteine fallen in relativ verdünnten Lösungen an. Sie müssen ebenso wie extra-
30 zelluläre Proteine vor ihrer weiteren Verwendung konzentriert werden. Neben den schon erwähnten Verfahren hat sich – auch im industriellen Maßstab – die Ultrafiltration bewährt.

Anorganische Salze als Begleitstoffe von Proteinen sind für spezifische Anwendungen häufig unerwünscht. Sie können u.a. durch Gelfiltration, Dialyse und Diafiltration entfernt werden.

Zahlreiche Proteine kommen als Trockenpräparate zum Einsatz. Als Trocknungsverfahren sind die Vakuum-, Gefrier- und Sprühtrocknung von Bedeutung.

5 Nukleotid- und Aminosäuresequenzen

Das Photoprotein mtClytin wird durch die folgende Nukleotidsequenz kodiert (SEQ ID NO: 1):

5'-
 gacagataaaaaattcactccttagattatttagtgaataagagaaaaaaggataagaaatcaag
 atgcaaagggtttacaaatcgtcttcttccatgtcggctttacgtgcaagatcaagattgcaacgc
 10 acggcaaattttcacaccagcatactcttggctacagattcaaaatacgcggtcaaaactcgatcct
 gatcttgcaaatccaaatggatcaacagacacaaatcttatgttcaactttttggacataaacggt
 aaggggaaaatcacattagatgaaatcgtctccaaagcttcagacgacatttgtgctaaactggat
 gcaacaccagaacagaccaaacgtcaccaggatgctgttgaagccttttcaagaaaatgggcatg
 gattatggtaagaagttgcattcccagaatttattaagggatgggaagagttggccgaacacgac
 15 ttggaactctggtctcaaaacaaaagtacattgatccgtgaatggggagatgctgttttcgacatt
 ttcgacaaagacgcaagtggctcaatcagtttagacgaatggaaggcttacggacgaatctctgga
 atctgtccatcagacgaagacgctgagaagacgttcaaacattgtgatttggacaacagtggcaaa
 cttgatgttgatgagatgaccaggcaacatttaggcttctggtacacattggatccaacttctgat
 ggtcttttatggcaattttgttccctaagaagcgttcagttaaaaacgctaaacattgttcagttgt
 20 aaaattatatcatttttcatttcgtaaaattagattttataaatttgtatcataaattgtatccat
 gttgtagactaaataagactcggcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa -3'.

Daraus ergibt sich eine Aminosäuresequenz von (SEQ ID NO: 2):

MQRFTNRLLSMSALRARSRLQRTANFHTSILLATDSKYAVKLDPDFANPKWINRHKFMFN
 FLDINGKGKITLDEIVSKASDDICAKLDATPEQTKRHQDAVEAFFKKMGMDYGKEVAFPE
 25 FIKGWEELAEHDLELWSQNKSTLREWGDVDFIDFKDASGSISLDEWKAYGRISGICPSDE
 DAEKTFKHCDLDNSGKLDVDEMTRQHLGFWYTLDPDGLYGNFVP

Das putative Signalpeptide des Photoprotein mtClytin besitzt folgende Sequenz (SEQ ID NO: 3):

MQRFTNRLLSMSALRA

und weist folgende Nukleinsäuresequenz auf:

30 5'- atgcaaagggtttacaaatcgtcttcttccatgtcggctttacgtgca - 3' (SEQ ID NO 4)

Das Photoprotein Clytin-2 wird durch die folgende Nukleotidsequenz kodiert (SEQ ID NO: 5):

5'-
 GATCTCAGCTCAACTTGCAATAAGTATCAGATCAAATTTTGCAACTCAAAGCAAATCA
 TCAACTTCATCATAATGACTGACACTGCTTCAAATACGCTGTCAAAGCAAGACCAA
 CTTTGAAGATCCAAAATGGGTCAACAGACACAAATTTATGTTCAACTTTTTGGACATT
 5 AACGGCAACGGAAAAATCACTTTGGATGAAATTGTCTCCAAAGCTTCGGATGACATTT
 GCGCCAAACTTGGAGCTACACCAGCTCAAACCCAACGTCATCAGGAAGCTGTTGAAGC
 TTTCTTCAAGAAGATTGGTTTGGATTATGGCAAAGAAGTCGAATTCCCAGCTTTCGTTA
 ACGGATGGAAAGAACTGGCCAAACATGACTTGAAACTTTGGTCCCAAACAAGAAAT
 CTTTGATCCGCAATTGGGGAGAAGCTGTATTCGACATTTTCGACAAGGACGGAAGTGG
 10 CTCAATCAGTTTGGACGAATGGAAAACATACGGAGGAATCTCTGGAATCTGTCCATCA
 GACGAAGACGCTGAAAAGACCTTCAAACATTGCGATTTGGACAACAGTGGCAAACCTT
 GATGTTGACGAGATGACCAGACAACATTTGGGATTCTGGTACACCTTGGACCCTAACG
 CTGATGGTCTTTATGGCAACTTTGTCCCTTAAAACTTTTTTTGCTGTAAATTCTTTACG
 GGTTATTTTTTCATAATTGTCATTTGATTTTAACTTTGTTTCGGAAAATGAAAAATATT
 15 CTTTATTCAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA - 3'

daraus ergibt sich eine Aminosäuresequenz von (SEQ ID NO: 6):

MTDTASKYAVKLKTNFEDPKWVNRHKFMFNFLDINGNGKITLDEIVSKASDDICAKLGAT
 PAQTQRHQEAVEAFFKKIGLDYGKEVEFPFVNGWKELAKHDLKLWSQNKKSLIRNWGE
 AVFDIFDKDGSISLDEWKTYGGISGICPSDEDAEKTFFKHCDLDNSGKLDVDEMTRQHLG
 20 FWYTLDPNADGLYGNFVP

Diese Sequenzen finden sich im Sequenzlisting wieder.

Kurze Beschreibung der Figuren

Figur 1: Die Figur 1 zeigt die Plasmidkarte des Vektors pTriplEX2-mtClytin.

Figur 2: Die Figur 2 zeigt die Plasmidkarte des Vektors pcDNA3-mtClytin.

Figur 3: Die Figur 3 zeigt das Ergebnis der bakteriellen Expression von mtClytin, sowie die Biolumineszenzaktivität von mtClytin nach bakterieller Expression. (Y = RLU : relative light units; X = Verdünnung; schwarze Balken = mtClytin; graue Balken = Kontrolllysat).

Figur 4: Die Figur 4 zeigt das Ergebnis der eukaryotischen Expression von mtClytin, sowie die Biolumineszenzaktivität von mtClytin nach Expression in CHO

Zellen. (Y = RLU : relative light units; X = ATP (logarithmische Darstellung in mol/l)).

Figur 5: Die Fig. 5 zeigt die kinetische Analyse der Biolumineszenz von mtClytin. (Y = RLU : relative light units; X = Zeit [Sekunden]).

Figur 6: Die Fig. 6 zeigt die kinetische Analyse der Biolumineszenz von Obelin. (Y = RLU : relative light units; X = Zeit [Sekunden]).

Figur 7: Die Figur 7 zeigt das Aligment von Clytin und mtCyltin auf Aminosäureebene.

Figur 8: Die Figur 8 zeigt das Aligment von Clytin und mtCyltin auf Nukleinsäureebene.

5 Figur 9: Die Figur 9 zeigt das Aligment von Clytin, mtCyltin und Clytin-2 auf Aminosäureebene.

Beispiele

Beispiel 1

Als Vektor zur Herstellung des im folgenden dargestellten Konstruktes wurde das Plasmid pTriplEx2 der Firma Clontech verwendet. Das Derivat des Vektors wurde als pTriplEx2-mtClytin bezeichnet. Der Vektor pTriplEx2-mtClytin wurde zur Expression von mtClytin in bakteriellen Systemen verwendet.

Die Figur 1 zeigt die Plasmidkarte des Vektors pTriplEX2-mtClytin .

Beispiel 2

Als Vektor zur Herstellung des im folgenden dargestellten Konstruktes wurde das Plasmid pcDNA3.1(+) der Firma Clontech verwendet. Das Derivat des Vektors wurde als pcDNA3-mtClytin bezeichnet. Der Vektor pcDNA3-mtClytin wurde zur Expression von mtClytin in eukaryotischen Systemen verwendet.

Die Figur 2 zeigt die Plasmidkarte des Vektors pcDNA3-mtClytin .

Beispiel 3

15 **Bakterielle Expression**

Die bakterielle Expression erfolgte im E. coli Stamm BL21(DE3) durch Transformation der Bakterien mit den Expressionsplasmiden pTriplEX2-mtClytin und pTriplEX2. Die transformierten Bakterien wurden in LB-Medium bei 37°C für 3 Stunden inkubiert und die Expression für 4 Stunden durch Zugabe von IPTG bis zu einer Endkonzentration von 1 mM induziert. Die induzierten Bakterien wurden durch Zentrifugation geerntet, in 50 mM Tris/HCl (pH 9,0) + 5 mM EDTA resuspendiert und durch Ultraschall aufgeschlossen. Das Lysat wurde anschließend für 15 Minuten bei 13000 Umdrehungen pro Minute (16000 rcf) zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Der Überstand (Verdünnungen 1:5; 1:10; 1:20 und 1:50 mit Tris/HCl pH 9,0)) wurde 3 Stunden mit Coelenterazin (10E-07 M Coelenterazine in Tris/HCl pH 9,0) im dunkeln inkubiert. Direkt nach der Zugabe von 5 mM Calciumchlorid wurde die Biolumineszenz im Luminometer gemessen. Die Integrationszeit der Messung betrug 40 Sekunden.

Die Figur 3 zeigt die Ergebnisse der Biolumineszenzmessung von mtClytin in Bakterien.

Beispiel 4**Eukaryotische Expression**

- Die konstitutive eukaryotische Expression erfolgte in CHO-Zellen durch Transfektion der Zellen mit den Expressionsplasmiden pcDNA3-mtClytin und pcDNA3.1(+) in transienten Experimenten.
- 5 Hierzu wurden 10000 Zellen pro Loch in DMEM-F12 Medium auf 96 Loch Mikrotiterplatten plattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Transfektion erfolgte mit Hilfe des Fugene 6 Kits (Roche) nach Herstellerangaben. Die transfizierten Zellen wurden über Nacht bei 37°C in DMEM-F12 Medium inkubiert. Anschließend wurde das Medium entfernt und durch 50 µl Coelenterazin (10E-07 M Coelenterazine in PBS) ersetzt. Die Zellen wurden für 3 Stunden bei 37°C inkubiert
- 10 und anschließend ATP (Adenosintriphosphat) bis zu einer Finalkonzentration von 1 µM zugegeben. Die Messung wurde direkt nach der Zugabe im Luminometer gestartet. Die Integrationszeit betrug 1 Sekunde, bei einer Gesamtmessdauer von 60 Sekunden.

Die Figur 4 zeigt die Ergebnisse der Biolumineszenzmessung von mtClytin in CHO Zellen.

Beispiel 5**15 BLAST**

Ergebnis einer BLAST-Analyse von mtClytin auf der Aminosäureebene.

- ```
>emb|CAD87655.1| unnamed protein product [Clytia gregaria], Length
= 198, Score = 368 bits (945), Expect = e-101, Identities =
171/195 (87%), Positives = 182/195 (92%)
```
- 20 >sp|Q08121|CLYT\_CLYGR Clytin precursor (Phialidin), pir||S28860  
clytin - hydromedusa (Clytia gregarium), emb|CAA49754.1| clytin  
[Clytia gregaria], gb|AAA28293.1| apoclytin, Length = 198, Score =  
368 bits (945), Expect = e-101, Identities = 171/195 (87%),  
Positives = 182/195 (92%)
- 25 >emb|CAD87658.1| unnamed protein product [synthetic construct],  
Length = 198, Score = 367 bits (943), Expect = e-101, Identities  
= 170/195 (87%), Positives = 182/195 (93%)
- ```
>sp|Q27709|OBL_OBELO Obelin precursor (OBL), pdb|1EL4|A Chain A,  
Structure Of The Calcium-Regulated Photoprotein Obelin, Determined  
30 By Sulfur Sas, gb|AAA67708.1| unnamed protein product, Length =
```

195, Score = 327 bits (837), Expect = 1e-88, Identities = 150/193 (77%), Positives = 170/193 (87%)

>emb|CAD87674.1| unnamed protein product [synthetic construct],
Length = 195, Score = 326 bits (835), Expect = 2e-88, Identities
5 = 149/193 (77%), Positives = 170/193 (87%)

>emb|CAD87672.1| unnamed protein product [synthetic construct],
Length = 195, Score = 325 bits (834), Expect = 3e-88, Identities
= 149/193 (77%), positives = 170/193 (87%)

>emb|CAD87673.1| unnamed protein product [synthetic construct],
10 Length = 195, Score = 325 bits (833), Expect = 4e-88, Identities
= 149/193 (77%), Positives = 170/193 (87%)

>pdb|1JF0|A Chain A, The Crystal Structure Of Obelin From Obelia
Geniculata At 1.82 A Resolution, gb|AAL86372.1|AF394688_1
apoobelin [Obelia geniculata], Length = 195, Score = 325
15 bits (833), Expect = 4e-88, Identities = 149/193 (77%), Positives
= 168/193 (86%)

Beispiel 6

BLAST

Ergebnis einer BLAST-Analyse von mtClytin auf Nukleinsäureebene:

20 >emb|AX702125.1| Sequence 23 from Patent WO03006497, Length = 597,
Score = 669 bits (348), Expect = 0.0, Identities = 504/582 (86%)

>emb|AX702119.1| Sequence 17 from Patent WO03006497, Length = 597,
Score = 669 bits (348), Expect = 0.0, Identities = 504/582 (86%)

>emb|X70221.1|CGCLYTIN C.gregaria mRNA for clytin, Length = 747,
25 Score = 669 bits (348), Expect = 0.0, Identities = 504/582 (86%)

>gb|L13247.1|CY1APOCLYT Clytia gregarium apoclytin mRNA, complete
cds, Length = 747, Score = 669 bits (348), Expect = 0.0,
Identities = 504/582 (86%)

>emb|AX702187.1| Sequence 85 from Patent WO03006497, Length = 597,
30 Score = 664 bits (345), Expect = 0.0, Identities = 503/582 (86%)

- >emb|AX702185.1| Sequence 83 from Patent WO03006497, Length = 597,
Score = 664 bits (345), Expect = 0.0, Identities = 503/582 (86%)
- >emb|AX702183.1| Sequence 81 from Patent WO03006497, Length = 597,
Score = 664 bits (345), Expect = 0.0, Identities = 503/582 (86%)
- 5 >emb|AX702181.1| Sequence 79 from Patent WO03006497, Length = 597,
Score = 664 bits (345), Expect = 0.0, Identities = 503/582 (86%)
- >emb|AX702179.1| Sequence 77 from Patent WO03006497, Length = 597,
Score = 664 bits (345), Expect = 0.0, Identities = 503/582 (86%)
- 10 >emb|AX702131.1| Sequence 29 from Patent WO03006497, Length = 597,
Score = 664 bits (345), Expect = 0.0, Identities = 503/582 (86%)
- >emb|AX702129.1| Sequence 27 from Patent WO03006497, Length = 597,
Score = 664 bits (345), Expect = 0.0, Identities = 503/582 (86%)

Beispiel 7

Die Figur 7 zeigt das Alignment von mtClytin mit Clytin (*Clytia gregaria*) auf Nukleinsäureebene.

15 Beispiel 8

Die Figur 8 zeigt das Alignment von mtClytin mit Clytin (*Clytia gregaria*) auf Aminosäureebene.

Beispiel 9

Kinetische Analyse von mtClytin

- 20 Zur kinetischen Analyse der Biolumineszenz von mtClytin, wurden CHO Zellen mit pcDNA3-mtClytin bzw. pcDNA-Obelin oder pcDNA3 (ohne integrierte cDNA) transient transfiziert. Die Transfektion und Messung erfolgte wie unter Beispiel 4 beschrieben. Die Messdaten wurden für einen Zeitraum von 60 Sekunden mit einer Integrationszeit von 1 Sekunde erhoben.

Die Figuren 5 und 6 zeigen die Ergebnisse der kinetischen Analyse von mtClytin und Obelin.

Beispiel 10**MITOPROT-Analyse**

Zur Analyse des Signalpeptides von mtClytin wurde das Computerprogramm MITOPROT verwendet (Claros et al., 1996). Folgende Photoproteine wurden analysiert: Obelin (Q27709),
5 Aequorin (P07164), Clytin (Q08121) und mtClytin (SEQ ID NO. 2).

Ergebnisse der Analysen:

Obelin:

Sequence name: OBELIN

Input sequence length : 195 aa

5

VALUES OF COMPUTED PARAMETERS

Net charge of query sequence : -11

Analysed region : 11

Number of basic residues in targeting sequence : 3

10 Number of acidic residues in targeting sequence : 0

Cleavagesite : not predictable

Cleaved sequence : -

HYDROPHOBIC SCALE USED

15

	GES	KD	GVH1	ECS
H17	-0.624	0.259	-0.308	0.295
MesoH	-1.573	-0.241	-0.642	0.060
MuHd_075	14.019	3.641	4.408	1.523
MuHd_095	7.994	7.898	3.285	1.838
20 MuHd_100	13.734	9.836	5.597	2.742
MuHd_105	21.195	11.755	7.339	4.117
Hmax_075	-9.450	-2.800	-4.008	1.132
Hmax_095	-0.963	1.837	-1.971	1.103
Hmax_100	0.400	1.300	-1.942	2.240
25 Hmax_105	10.617	6.067	0.733	3.127

PROBABILITY

of export to mitochondria: 0.1479

Aequorin:

30

Sequence name: AEQUORIN

Input sequence length : 196 aa

VALUES OF COMPUTED PARAMETERS

Net charge of query sequence : -13

35 Analysed region : 3

Number of basic residues in targeting sequence : 0

Number of acidic residues in targeting sequence : 0

Cleavage site : not predictable

Cleaved sequence : -

HYDROPHOBIC SCALE USED

		GES	KD	GVH1	ECS
5	H17	0.006	0.794	-0.263	0.368
	MesoH	-1.673	-0.382	-0.703	0.048
	MuHd_075	24.326	4.153	5.947	2.450
	MuHd_095	12.638	7.213	4.218	1.796
	MuHd_100	13.748	8.827	4.477	2.427
10	MuHd_105	16.581	11.426	5.056	3.453
	Hmax_075	0.438	0.233	-2.490	1.692
	Hmax_095	0.525	-1.400	-2.394	0.674
	Hmax_100	-0.100	-1.200	-2.292	1.550
	Hmax_105	0.500	-0.000	-2.164	1.540

15

PROBABILITY

of export to mitochondria: 0.0148

Clytin:

Sequence name: CLYTIN

20 Input sequence length : 198 aa

VALUES OF COMPUTED PARAMETERS

Net charge of query sequence : -9
 Analysed region : 32
 25 Number of basic residues in targeting sequence : 6
 Number of acidic residues in targeting sequence : 2
 Cleavage site : not predictable
 Cleaved sequence : -

30

HYDROPHOBIC SCALE USED

		GES	KD	GVH1	ECS
	H17	-0.429	0.341	-0.313	0.313
	MesoH	-1.778	-0.307	-0.718	0.053
	MuHd_075	32.928	17.509	7.351	5.708
35	MuHd_095	30.874	20.344	9.074	5.834
	MuHd_100	36.596	22.666	10.051	6.762
	MuHd_105	39.174	19.336	10.379	7.609
	Hmax_075	4.900	7.087	-1.223	3.684
	Hmax_095	13.600	10.100	1.251	4.390

Hmax_100	:	14.000	12.600	1.601	5.060
Hmax_105	:	6.650	13.067	-0.468	3.920

 PROBABILITY

5 of export to mitochondria: 0.2047

Clytin-2:

Sequence name: CLYTIN-2

 Input sequence length : 198 aa

10 VALUES OF COMPUTED PARAMETERS

Net charge of query sequence : -7

Analysed region : 16

Number of basic residues in targeting sequence : 3

Number of acidic residues in targeting sequence : 1

15 Cleavage site : not predictable

 Cleaved sequence : -

HYDROPHOBIC SCALE USED

		GES	KD	GVH1	ECS
20	H17	-0.288	0.341	-0.213	0.313
	MesoH	-1.519	-0.206	-0.681	0.081
	MuHd_075	32.594	15.092	8.192	4.075
	MuHd_095	36.090	19.707	8.836	6.716
	MuHd_100	38.617	20.269	9.682	6.851
25	MuHd_105	30.267	16.082	8.229	5.470
	Hmax_075	6.533	6.417	-0.793	2.508
	Hmax_095	13.600	10.100	1.251	4.390
	Hmax_100	13.600	10.100	1.251	4.390
	Hmax_105	13.417	10.150	1.612	3.862

 30

PROBABILITY

of export to mitochondria: 0.3974

mtClytin:

Sequence name: mtClytin

 35 Input sequence length : 228 aa

VALUES OF COMPUTED PARAMETERS

Net charge of query sequence : -8

Analysed region : 34

Number of basic residues in targeting sequence : 6

Number of acidic residues in targeting sequence : 0

Cleavage site : 17

Cleaved sequence : MQRFTNRLLSMSALRA

5

HYDROPHOBIC SCALE USED

		GES	KD	GVH1	ECS
	H17	-0.135	0.453	-0.343	0.309
	MesoH	-1.623	-0.215	-0.701	0.073
10	MuHd_075	33.394	19.322	8.634	7.593
	MuHd_095	34.726	19.634	8.110	8.861
	MuHd_100	32.825	16.596	7.376	7.520
	MuHd_105	28.005	19.893	7.410	7.865
	Hmax_075	16.683	17.733	2.851	5.763
15	Hmax_095	13.125	13.388	2.299	4.314
	Hmax_100	8.300	11.500	1.845	3.830
	Hmax_105	1.700	9.500	-1.171	2.390

PROBABILITY

20 of export to mitochondria: 0.9974

Die Wahrscheinlichkeit einer Translokation des analysierten Peptides in Mitochondrien steigt mit der Annäherung des berechneten Faktors an 1.

Die Analyse der Proteinsequenzen von Obelin, Aequorin, Clytin, Clytin-2 und mtClytin hat ergeben, dass nur mtClytin die Merkmale eines Proteins aufweist, dass in Mitochondrien transportiert werden kann.

25

Beispiel 11

Die Figur 9 zeigt das Alignment von mtClytin, Clytin (Clytia gregaria) und Clytin-type2 auf Aminosäureebene.

Literatur / Patente

30 US 6,495,355

US 5,541,309

US 5,093,240

US-0908909

US 6,152,358

35 JP-0176125

GB-0024357

WO03006497

WO200168824

- Alam J, Cook JL. Reporter genes: application to the study of mammalian gene transcription. *Anal Biochem.* 1990 Aug 1;188(2):245-54

Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997); Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs; *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402

10

Chiesa A, Rapizzi E, Tosello V, Pinton P, de Virgilio M, Fogarty KE, Rizzuto R. Recombinant aequorin and green fluorescent protein as valuable tools in the study of cell signalling. *Biochem J.* 2001 Apr 1;355(Pt 1):1-12.

- 15 Claros, M.G., Vincens, P. (1996); Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *Eur. J. Biochem* 241, 779-786.

Cullen Bryan R., Malim Michael H., Secreted placental alkaline phosphatase as a eukaryotic reporter gene. *Methods in Enzymology.* 216:362ff

20

Fagan TF, Ohmiya Y, Blinks JR, Inouye S, Tsuji FI. Cloning, expression and sequence analysis of cDNA for the Ca(2+)-binding photoprotein, mitrocomin. *FEBS Lett.* 1993 Nov 1;333(3):301-5

- 25 Hastings, J.W. and Morin, J.G. (1969) Comparative biochemistry of calcium-activated photoproteins from the ctenophore, *Mnemiopsis* and the coelenterates *Aequorea*, *Obelia*, and *Pelagia*. *Biol. Bull.* 137, 402.

- Haddock SH, Rivers TJ, Robison BH. Can coelenterates make coelenterazine? Dietary requirement for luciferin in cnidarian bioluminescence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001 Sep 30 25;98(20):11148-51

Inouye S, Tsuji FI. (1994) *Aequorea* green fluorescent protein. Expression of the gene and fluorescence characteristics of the recombinant protein. *FEBS Lett* 1994 Mar 21;341(2-3):277-80

- 35 Inouye S, Tsuji FI. Cloning and sequence analysis of cDNA for the Ca(2+)-activated photoprotein, clytin. *FEBS Lett.* 1993 Jan 11;315(3):343-6.

- Illarionov BA, Bondar VS, Illarionova VA, Vysotski ES. Sequence of the cDNA encoding the Ca(2+)-activated photoprotein obelin from the hydroid polyp *Obelia longissima*. *Gene*. 1995 Feb 14;153(2):273-4.
- 5 Jones K, Hibbert F, Keenan M. Glowing jellyfish, luminescence and a molecule called coelenterazine. *Trends Biotechnol* 1999 Dec;17(12):477-81
- 10 Johnson, F.H., Shimomura, O., Saiga, Y., Gershman, L.C., Reynolds, G.T., and Waters, J.R. (1962) Quantum efficiency of *Cypridina* luminescence, with a note on that of *Aequorea*. *J. Cell. Comp. Physiol.* 60, 85-103.
- Morin, J.G. and Hastings, J.W. (1971) Biochemistry of the bioluminescence of colonial hydroids and other coelenterates. *J. Cell. Physiol.* 77, 305-311.
- 15 Phillips GN, Structure and dynamics of green fluorescent protein. *Curr Opin Struct Biol.* 1997 Dec;7(6):821-7
- 20 Sambrook, J., Fritsch, E. Maniatis, T. 1989, Molecular cloning. A laboratory manual Vol 1-3, Cold Spring Harbor, New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Shimomura O, Johnson FH. Properties of the bioluminescent protein aequorin. *Biochemistry*. 1969 Oct;8(10):3991-7
- 25 Shimomura O., Bioluminescence in the sea: photoprotein systems. *Symp Soc Exp Biol.* 1985;39:351-72
- Shimomura O. Isolation and properties of various molecular forms of aequorin. *Biochem J*. 1986 Mar 1;234(2):271-7.
- 30 Snowdowne KW, Borle AB. Measurement of cytosolic free calcium in mammalian cells with aequorin. *Am J Physiol.* 1984 Nov;247(5 Pt 1):C396-408.
- 35 Ward, W.W. (1998) Biochemical and physical properties of green fluorescent protein. In: *Green Fluorescent Protein: Properties, Applications, and Protocols* (Chalfie, M. and Kain, S., eds) pp. 45-70. Wiley-Liss, Inc.

Yang Te-Tuan, Sinai Parisa, Kitts Paul A. Kain Seven R., Quantification of gene expresssion with a secreted alkaline phosphatase reporter system. *Biotechnology*. 1997 23(6) 1110ff

Patentansprüche

1. Nukleinsäuremolekül, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus
 - a) Nukleinsäuremolekülen, die ein Polypeptid kodieren, welches die Aminosäuresequenz offenbart durch SEQ ID NO: 2 beinhaltet;
 - 5 b) Nukleinsäuremolekülen, welche die in SEQ ID NO: 1 dargestellte Sequenz beinhalten;
 - c) Nukleinsäuremolekülen, deren komplementärer Strang mit einem Nukleinsäuremolekül aus a) oder b) unter stringenten Bedingungen hybridisiert und welche ein Polypeptid kodieren, das die biologische Funktion eines Photoproteins aufweist;
 - 10 d) Nukleinsäuremolekülen, welche sich auf Grund der Degenerierung des genetischen Kodes von den unter c) genannten unterscheiden;
 - e) Nukleinsäuremolekülen, welche eine Sequenzhomologie von mindestens 95 % zu SEQ ID NO: 1 zeigen, und welche ein Polypeptid kodieren, das die biologische Funktion eines Photoproteins aufweist; und
 - 15 f) Nukleinsäuremolekülen, welche eine Sequenzhomologie von mindestens 65 % zu SEQ ID NO: 1 zeigen, und welche ein Polypeptid kodieren, das die biologische Funktion eines Photoproteins aufweist.
2. Nukleinsäuremolekül, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus
 - 20 a) Nukleinsäuremolekülen, die ein Polypeptid kodieren, welches die Aminosäuresequenz offenbart durch SEQ ID NO: 3 beinhaltet;
 - b) Nukleinsäuremolekülen, welche die in SEQ ID NO: 4 dargestellte Sequenz beinhalten;
 - c) Nukleinsäuremolekülen, deren komplementärer Strang mit einem Nukleinsäuremolekül aus a) oder b) unter stringenten Bedingungen hybridisiert und welche ein Peptid kodieren, das die biologische Funktion eines Signal- oder Leaderpeptides aufweist;
 - 25 d) Nukleinsäuremolekülen, welche sich auf Grund der Degenerierung des genetischen Kodes von den unter c) genannten unterscheiden;

- 33 -

- e) Nukleinsäuremolekülen, welche eine Sequenzhomologie von mindestens 90 % zu SEQ ID NO: 4 zeigen, und welche ein Peptid kodieren, das die biologische Funktion eines Signal- bzw. Leaderpeptides aufweist; und
- f) Nukleinsäuremolekülen, welche eine Sequenzhomologie von mindestens 60 % zu SEQ ID NO: 4 zeigen, und welche ein Peptid kodieren, das die biologische Funktion eines Signal- bzw. Leaderpeptides aufweist.
3. Nukleinsäuremolekül, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus
- a) Nukleinsäuremolekülen, die ein Polypeptid kodieren, welches die Aminosäuresequenz offenbart durch SEQ ID NO: 6 beinhaltet;
- b) Nukleinsäuremolekülen, welche die in SEQ ID NO: 5 dargestellte Sequenz beinhalten;
- c) Nukleinsäuremolekülen, deren komplementärer Strang mit einem Nukleinsäuremolekül aus a) oder b) unter stringenten Bedingungen hybridisiert und welche ein Polypeptid kodieren, das die biologische Funktion eines Photoproteins aufweist;
- d) Nukleinsäuremolekülen, welche sich auf Grund der Degenerierung des genetischen Kodes von den unter c) genannten unterscheiden;
- e) Nukleinsäuremolekülen, welche eine Sequenzhomologie von mindestens 95 % zu SEQ ID NO: 5 zeigen, und welche ein Polypeptid kodieren, das die biologische Funktion eines Photoproteins aufweist; und
- f) Nukleinsäuremolekülen, welche eine Sequenzhomologie von mindestens 80 % zu SEQ ID NO: 5 zeigen, und welche ein Polypeptid kodieren, das die biologische Funktion eines Photoproteins aufweist.
4. Nukleinsäure nach Anspruch 1, 2 oder 3, welche einen funktionalen Promotor 5' zur kodierenden Sequenz enthält.
5. Rekombinante DNA oder RNA Vektoren, welche Nukleinsäuren nach Anspruch 4 enthalten.
6. Organismen, die einen Vektor gemäß Anspruch 5 enthalten.

7. Oligonukleotide mit mehr als 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden, die identisch oder komplementär zu einer Teilsequenz eines Nukleinsäuremoleküls gemäß Anspruch 1, 2 oder 3 sind.
8. Polypeptid, das durch eine Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 1, 2 oder 3 kodiert ist.
- 5 9. Verfahren zur Expression der Polypeptide gemäß Anspruch 8 in Bakterien, viralen Systemen, Hefen oder eukaryontischen Zellen oder in *in vitro* Expressionssystemen.
10. Verfahren zur Aufreinigung/Isolierung eines Photoprotein Polypeptides gemäß Anspruch 8.
- 10 11. Peptide mit mehr als 5 aufeinanderfolgenden Aminosäuren, die immunologisch durch Antikörper gegen das Photoprotein mtClytin erkannt werden.
12. Peptide mit mehr als 5 aufeinanderfolgenden Aminosäuren, die immunologisch durch Antikörper gegen das Photoprotein Clytin-2 erkannt werden.
13. Peptide mit mehr als 5 aufeinanderfolgenden Aminosäuren, die immunologisch durch Antikörper gegen das durch SEQ ID NO:3 offenbarte Signal- bzw. Leaderpeptid erkannt werden.
- 15 14. Verwendung einer Nukleinsäure gemäß den Ansprüchen 1 bis 5 als Marker- oder Reportergen.
15. Verwendung eines Photoproteins gemäß Anspruch 8 als Marker oder Reporter.
16. Verwendung einer Nukleinsäure, welche die als SEQ ID NO: 4 dargestellte Sequenz beinhaltet, als Signal- bzw. Leadersequenz.
- 20 17. Verwendung eines Peptides, welches die als SEQ ID NO: 3 dargestellte Sequenz beinhaltet, als Signal- bzw. Leaderpeptid.
18. Verwendung gemäß Anspruch 16 oder 17, um ein an das Signal- bzw. Leaderpeptid fusioniertes Protein in Zellorganellen zu transportieren.
- 25 19. Verwendung gemäß Anspruch 18, wobei es sich bei den Zellorganellen um Mitochondrien oder das endoplasmatische Retikulum (ER) handelt.
20. Verwendung der Polypeptide gemäß Anspruch 8 als Reporterproteine in der pharmakologischen Wirkstoffsuche.

- 35 -

21. Verwendung der Nukleinsäuren gemäß Ansprüchen 1-3 als Reportergene in der pharmakologischen Wirkstoffsuche.

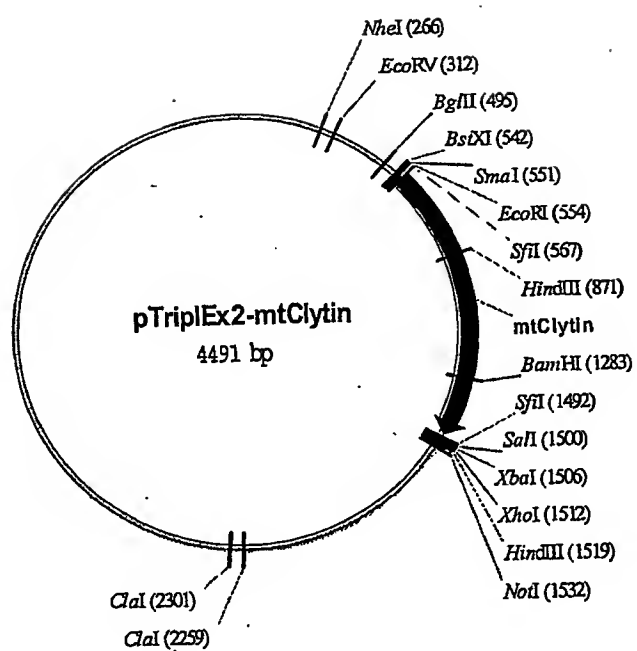
Figuren**Fig. 1**

Fig. 2

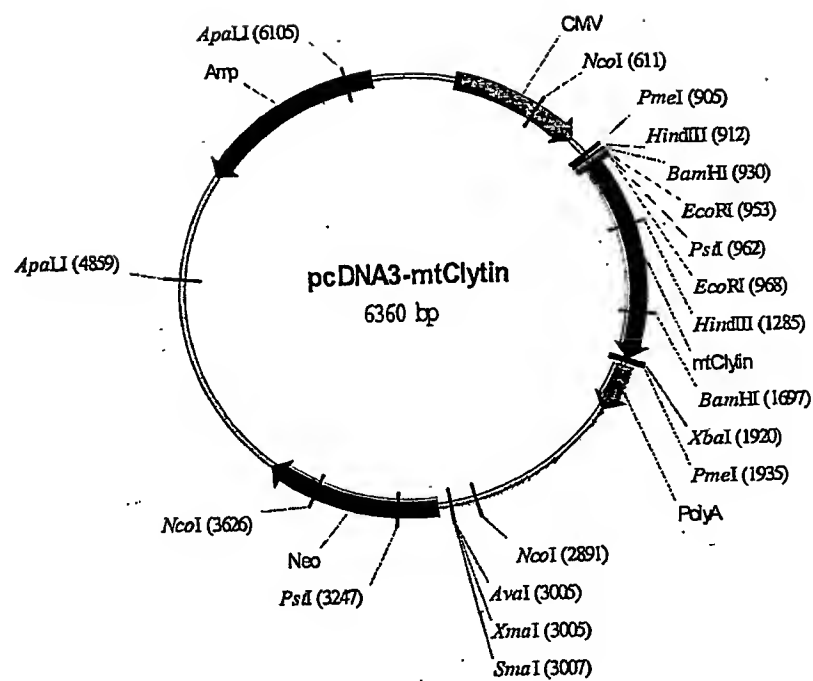


Fig. 3

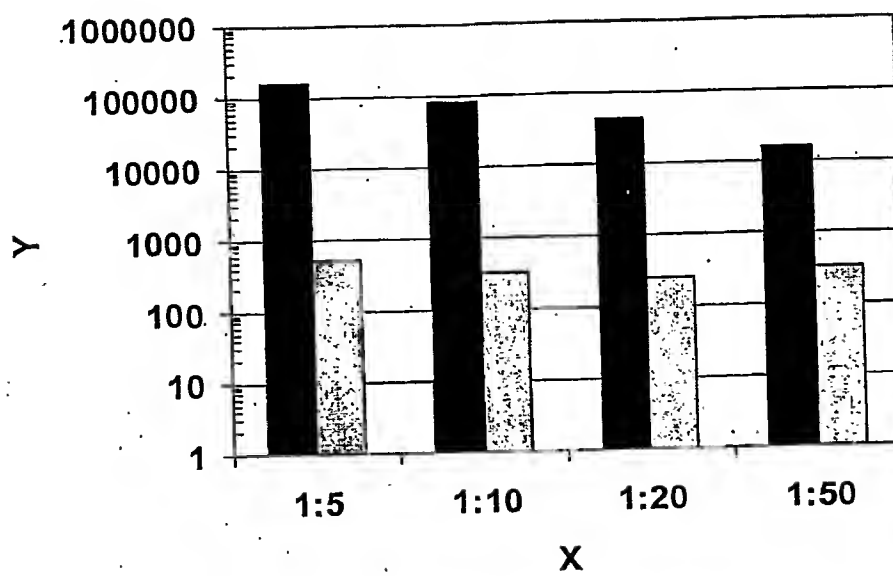


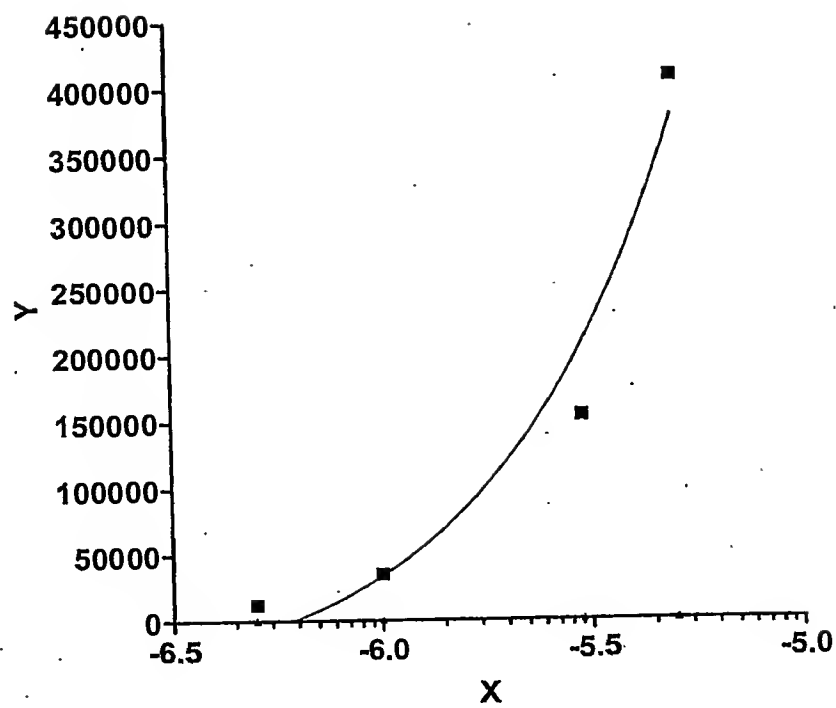
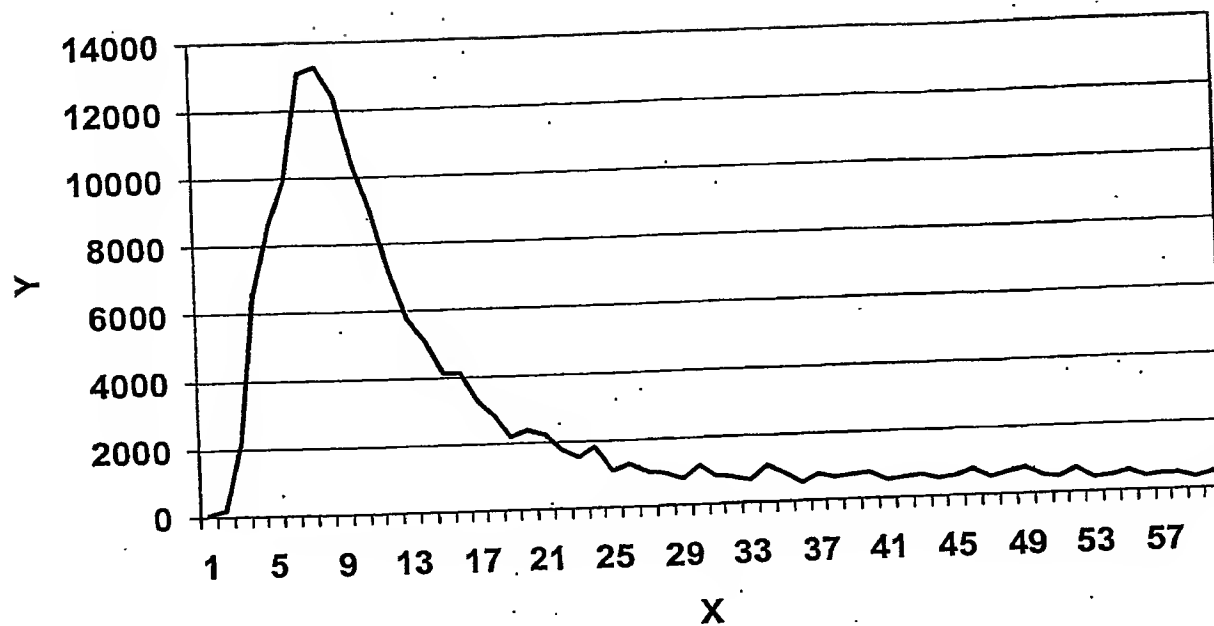
Fig. 4

Fig. 5



- 6/9 -

Fig. 6

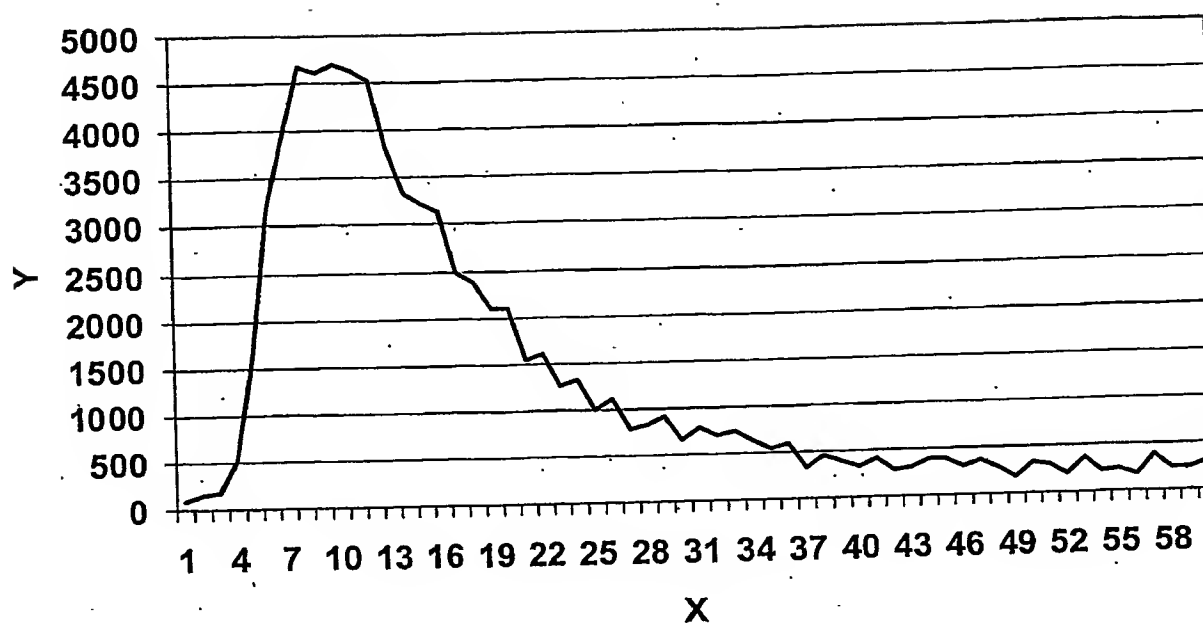


Fig. 7

1		50
Clytin	
mtClytin	GACAGATAAA AAATTCACCTC CTTAGATTAT TTAGTGAATA AGAGAAAAAA	
	51	100
Clytin	
mtClytin	AGGATAAGAA ATCAAGATGC AAAGGTTTAC AAATCGTCTT CTTTCCATGT	
	101	150
ClytinATCA ACTTTTGCAA CTCAAAGCAA ATTTCAAAC	
mtClytin	CGGCTTTACG TGCAAGATCA AGATT.GCAA.CGCACGGCAA ATTTTCACAC	
	151	200
Clytin	TTCAACATGG CTGAC.ACTG CATCAAAATA CGCCGTCAA CTCAGACCCA	
mtClytin	CAGCATACTC TTGGCTACAG ATTCAAAATA CGCGGTCAA CTCGATCCTG	
	201	250
Clytin	ACTTCGACAA CCCAAAATGG GTCAACAGAC ACAAATTTAT GTTCAACTTT	
mtClytin	ATTTTGCAA TCCAAAATGG ATCAACAGAC ACAAATTTAT GTTCAACTTT	
	251	300
Clytin	TTGGACATTA ACGGCGACGG AAAAATCACT TTGGATGAAA TCGTCTCCAA	
mtClytin	TTGGACATAA ACGGTAAGGG GAAAATCACA TTAGATGAAA TCGTCTCCAA	
	301	350
Clytin	AGCTTCGGAT GACATTTGCG CCAAACCTGG AGCAACACCA GAACAGACCA	
mtClytin	AGCTTCAGAC GACATTTGTG CTAAACTGGA TGCAACACCA GAACAGACCA	
	351	400
Clytin	AACGTCACCA GGATGCTGTC GAAGCTTTCT TCAAAAAGAT TGGTATGGAT	
mtClytin	AACGTCACCA GGATGCTGTT GAAGCCTTTT TCAAGAAAAAT GGGCATGGAT	
	401	450
Clytin	TATGGTAAAG AAGTCGAATT CCCAGCTTTT GTTGATGGAT GGAAAGAACT	
mtClytin	TATGGTAAAG AAGTGCATT CCCAGAATTT ATTAAGGGAT GGAAGAGTT	
	451	500
Clytin	GGCCAATTAT GACTTGAAAC TTTGGTCTCA AAACAAGAAA TCTTTGATCC	
mtClytin	GGCCGAACAC GACTTGGAAC TCTGGTCTCA AAACAAAAGT ACATTGATCC	
	501	550
Clytin	GCGACTGGGG AGAAGCTGTT TTCGACATTT TTGACAAAGA CGGAAGTGGC	
mtClytin	GTGAATGGGG AGATGCTGTT TTCGACATTT TCGACAAAGA CGCAAGTGGC	
	551	600
Clytin	TCAATCAGTT TGGACGAATG GAAGGCTTAT GGACGAATCT CTGGAATCTG	

- 8/9 -

```

mtClytin  TCAATCAGTT TAGACGAATG GAAGGCTTAC GGACGAATCT CTGGAATCTG
          601                                     650
Clytin     CTCATCAGAC GAAGACGCCG AAAAGACCTT CAAACATTGC GATTTGGACA
mtClytin   TCCATCAGAC GAAGACGCTG AGAAGACGTT CAAACATTGT GATTTGGACA
          651                                     700
Clytin     ACAGTGGCAA ACTTGATGTT GATGAGATGA CCAGACAACA TTTGGGATTC
mtClytin   ACAGTGGCAA ACTTGATGTT GATGAGATGA CCAGGCAACA TTTAGGCTTC
          701                                     750
Clytin     TGGTACACCT TGGACCCCAA CGCTGATGGT CTTTACGGCA ATTTTGTTC
mtClytin   TGGTACACAT TGGATCCAAC TTCTGATGGT CTTTATGGCA ATTTTGTTC
          751                                     800
Clytin     TTAAACATCG ...AAACAAA AGCCCAAAG AAGTTTGGGA AGAATTATTT
mtClytin   CTAAGAAGCG TTCAGTTAAA AACGCTAAAC ATTGTTTCAGT TGTAATAATTA
          801                                     850
Clytin     GATAC..TAT CATTTG.... ..TTACTATT TCGTAACATG CT..ATATTT
mtClytin   TATTCATTTT CATTTCGTAA AATTAGTATT TATAAATTG TATCATAAAT
          851                                     900
Clytin     TGTAAC.ATG CTATATT.TA AATAATTTT. ....
mtClytin   TGTATCCATG TTGTAGACTA AATAAGACTC GGCAAAAAA AAAAAAAA
          901                                     913
Clytin     .....
mtClytin   AAAAAAAAA AAA

```

Fig. 8

	1		50
mtClytin	MQRFTNRLLS MSALRARSRL QRTANFHTSI LLATDSKYAV KLDPDFANPK		
Clytin MADTASKYAV KLRPNFDNPK		
	51		100
mtClytin	WINRHKFMFN FLDINGGKI TLDEIVSKAS DDICAKLDAT PEQTKRHQDA		
Clytin	WVNRHKFMFN FLDINGDGKI TLDEIVSKAS DDICAKLGAT PEQTKRHQDA		
	101		150
Clytin	VEAFFKKMG M DYGKEVAFPE FIKGWEELAE HDLELWSQNK STLIREWGDA		
Clytin	VEAFFKKIG M DYGKEVEFPA FVDGWKELAN YDLKLWSQNK KSLIRDWGEA		
	151		200
Clytin	VFDIFDKDAS GSISLDEWKA YGRISGICPS DEDAECTFKH CDLDNSGKLD		
Clytin	VFDIFDKDGS GSISLDEWKA YGRISGICSS DEDAECTFKH CDLDNSGKLD		
	201	228	
mtClytin	VDEMTRQHLG FWYTLDPDSD GLYGNFVP		
Clytin	VDEMTRQHLG FWYTLDPNAD GLYGNFVP		

Fig. 9

	1		50
mtClytin	MQRFTNRLLS MSALRARSRL QRTANFHTSI LLATDSKYAV KLDPDFANPK		
Clytin-2 MTDTASKYAV KLKTNFEDPK		
Clytin MADTASKYAV KLRPNFDNPK		
	51		100
mtClytin	WINRHKFMFN FLDINGGKI TLDEIVSKAS DDICAKLDAT PEQTKRHQDA		
Clytin-2	WVNRHKFMFN FLDINGNGKI TLDEIVSKAS DDICAKLGAT PAQTQRHQEA		
Clytin	WVNRHKFMFN FLDINGDGKI TLDEIVSKAS DDICAKLGAT PEQTKRHQDA		
	101		150
mtClytin	VEAFFKKMG M DYGKEVAFPE FIKGWEELAE HDLELWSQNK STLIREWGDA		
Clytin-2	VEAFFKKIG L DYGKEVEFPA FVNGWKELAK HDLKLWSQNK KSLIRNWGEA		
Clytin	VEAFFKKIG M DYGKEVEFPA FVDGWKELAN YDLKLWSQNK KSLIRDWGEA		
	151		200
mtClytin	VFDIFDKDAS GSISLDEWKA YGRISGICPS DEDAECTFKH CDLDNSGKLD		
Clytin-2	VFDIFDKDGS GSISLDEWKT YGGISGICPS DEDAECTFKH CDLDNSGKLD		
Clytin	VFDIFDKDGS GSISLDEWKA YGRISGICSS DEDAECTFKH CDLDNSGKLD		
	201	228	
mtClytin	VDEMTRQHLG FWYTLDPDSD GLYGNFVP		
Clytin-2	VDEMTRQHLG FWYTLDPNAD GLYGNFVP		
Clytin	VDEMTRQHLG FWYTLDPNAD GLYGNFVP		

SEQUENCE LISTING

<110> Bayer AG, BHC

<120> Isoliertes Photoprotein mtClytin, sowie dessen Verwendung

<130> Le A 36 839

<160> 6

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 912

<212> DNA

<213> Clytia gregaria

<400> 1

```
gacagataaa aaattcactc cttagattat ttagtgaata agagaaaaaa aggataagaa      60
atcaagatgc aaagggtttac aaatcgtctt ctttccatgt cggctttacg tgcaagatca      120
agattgcaac gcacggcaaa ttttcacacc agcatactct tggctacaga ttcaaaatac      180
gcggtcaaac tcgatcctga ttttgcaaat ccaaaatgga tcaacagaca daaatttatg      240
ttcaactttt tggacataaa cggtaagggg aaaatccat tagatgaaat cgtctccaaa      300
gcttcagacg acatttgtgc taaactggat gcaacaccag aacagaccaa acgtcaccag      360
gatgctgttg aagccttttt caagaaaatg ggcatggatt atggtaaaga agttgcattc      420
ccagaattta ttaagggatg ggaagagttg gccgaacacg acttggaact ctggtctcaa      480
aacaaaagta cattgatccg tgaatgggga gatgctgttt tcgacatttt cgacaaagac      540
gcaagtggct caatcagttt agacgaatgg aaggcttacg gacgaatctc tggaatctgt      600
ccatcagacg aagacgctga gaagacgttc aaacattgtg atttggacaa cagtggcaaa      660
cttgatgttg atgagatgac caggcaacat ttaggcttct ggtacacatt ggatccaact      720
tctgatggtc tttatggcaa ttttgttccc taagaagcgt tcagttaaaa acgctaaaca      780
ttgttcagtt gtaaaattat attcattttc atttcgtaaa attagtattt ataaatttgt      840
atcataaatt gtatccatgt tgtagactaa ataagactcg gcaaaaaaaaa aaaaaaaaaa      900
aaaaaaaaaa aa                                                                912
```

<210> 2

<211> 228

<212> PRT

<213> Clytia gregaria

<400> 2

Met Gln Arg Phe Thr Asn Arg Leu Leu Ser Met Ser Ala Leu Arg Ala
 1 5 10 15
 Arg Ser Arg Leu Gln Arg Thr Ala Asn Phe His Thr Ser Ile Leu Leu
 20 25 30
 Ala Thr Asp Ser Lys Tyr Ala Val Lys Leu Asp Pro Asp Phe Ala Asn
 35 40 45
 Pro Lys Trp Ile Asn Arg His Lys Phe Met Phe Asn Phe Leu Asp Ile
 50 55 60
 Asn Gly Lys Gly Lys Ile Thr Leu Asp Glu Ile Val Ser Lys Ala Ser
 65 70 75 80
 Asp Asp Ile Cys Ala Lys Leu Asp Ala Thr Pro Glu Gln Thr Lys Arg
 85 90 95
 His Gln Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Lys Lys Met Gly Met Asp Tyr
 100 105 110
 Gly Lys Glu Val Ala Phe Pro Glu Phe Ile Lys Gly Trp Glu Glu Leu
 115 120 125
 Ala Glu His Asp Leu Glu Leu Trp Ser Gln Asn Lys Ser Thr Leu Ile
 130 135 140
 Arg Glu Trp Gly Asp Ala Val Phe Asp Ile Phe Asp Lys Asp Ala Ser
 145 150 155 160
 Gly Ser Ile Ser Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Gly Arg Ile Ser Gly
 165 170 175
 Ile Cys Pro Ser Asp Glu Asp Ala Glu Lys Thr Phe Lys His Cys Asp
 180 185 190
 Leu Asp Asn Ser Gly Lys Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Gln His
 195 200 205
 Leu Gly Phe Trp Tyr Thr Leu Asp Pro Thr Ser Asp Gly Leu Tyr Gly
 210 215 220
 Asn Phe Val Pro
 225

<210> 3

<211> 16

<212> PRT

<213> Clytia gregaria

<400> 3

Met Gln Arg Phe Thr Asn Arg Leu Leu Ser Met Ser Ala Leu Arg Ala
 1 5 10 15

<210> 4
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> *Clytia gregaria*

<400> 4
 atgcaaaggt ttacaaatcg tcttctttcc atgtcggctt tacgtgca 48

<210> 5
 <211> 791
 <212> DNA
 <213> *Clytia gregaria*

<400> 5
 gatctcagct caacttgcaa taagtatcag atcaaatttt gcaactcaaa gcaaatcatc 60
 aacttcatca taatgactga cactgcttca aaatacgtg tcaaaactcaa gaccaacttt 120
 gaagatccaa aatgggtcaa cagacacaaa tttatgttca actttttgga cattaacggc 180
 aacggaaaaa tcactttgga tgaaattgtc tccaaagctt cggatgacat ttgcgccaaa 240
 cttggagcta caccagctca aacccaacgt catcaggaag ctgttgaagc tttcttcaag 300
 aagattgggt tggattatgg caaagaagtc gaattcccag ctttcgttaa cggatggaaa 360
 gaactggcca aacatgactt gaaactttgg tcccaaaaca agaaatcttt gatccgcaat 420
 tggggagaag ctgtattcga cattttcgac aaggacggaa gtggctcaat cagtttggac 480
 gaatggaaaa catacggagg aatctctgga atctgtccat cagacgaaga cgctgaaaag 540
 accttcaaac attgcgattt ggacaacagt ggcaaacttg atgttgacga gatgaccaga 600
 caacatttgg gattctggta caccttggac cctaacgctg atggtcttta tggcaacttt 660
 gtcccttaaa aacttttttt gctgtaaatt ctttacgggt tattttttca taattgtcat 720
 ttgattttta ctttgtttcg gaaaatgaaa aatattcttt attcagaaaa aaaaaaaaaa 780
 aaaaaaaaaa a 791

<210> 6
 <211> 198
 <212> PRT
 <213> *Clytia gregaria*

<400> 6
 Met Thr Asp Thr Ala Ser Lys Tyr Ala Val Lys Leu Lys Thr Asn Phe
 1 5 10 15
 Glu Asp Pro Lys Trp Val Asn Arg His Lys Phe Met Phe Asn Phe Leu
 20 25 30
 Asp Ile Asn Gly Asn Gly Lys Ile Thr Leu Asp Glu Ile Val Ser Lys
 35 40 45
 Ala Ser Asp Asp Ile Cys Ala Lys Leu Gly Ala Thr Pro Ala Gln Thr
 50 55 60
 Gln Arg His Gln Glu Ala Val Glu Ala Phe Phe Lys Lys Ile Gly Leu
 65 70 75 80

Asp Tyr Gly Lys Glu Val Glu Phe Pro Ala Phe Val Asn Gly Trp Lys
 85 90 95
 Glu Leu Ala Lys His Asp Leu Lys Leu Trp Ser Gln Asn Lys Lys Ser
 100 105 110
 Leu Ile Arg Asn Trp Gly Glu Ala Val Phe Asp Ile Phe Asp Lys Asp
 115 120 125
 Gly Ser Gly Ser Ile Ser Leu Asp Glu Trp Lys Thr Tyr Gly Gly Ile
 130 135 140
 Ser Gly Ile Cys Pro Ser Asp Glu Asp Ala Glu Lys Thr Phe Lys His
 145 150 155 160
 Cys Asp Leu Asp Asn Ser Gly Lys Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg
 165 170 175
 Gln His Leu Gly Phe Trp Tyr Thr Leu Asp Pro Asn Ala Asp Gly Leu
 180 185 190
 Tyr Gly Asn Phe Val Pro
 195

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/009843

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C07K14/435 C12N5/10
G01N33/533

C12N15/12 C12Q1/68 G01N33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, EMBL, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE UniProt 1 October 1994 (1994-10-01), INOUE S. ET AL.: "Clytin precursor (Phialidin)" XP002300448 Database accession no. Q08121 the whole document	1,4-11, 14,15, 20,21
X	-& INOUE S ET AL: "CLONING AND SEQUENCE ANALYSIS OF CDNA FOR THE CA2+-ACTIVATED PHOTOPROTEIN, CLYTIN" FEBS LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 315, no. 3, January 1993 (1993-01), pages 343-346, XP001180448 ISSN: 0014-5793 cited in the application the whole document ----- -/-	1,4-11, 14,15, 20,21

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 November 2004

Date of mailing of the international search report

07 FEB 2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Huse, I

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP2004/009843

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL 10 March 2002 (2002-03-10), MARKOVA S. V. ET AL.: "Obelia geniculata apoobelin mRNA, complete cds" XP002305433 Database accession no. AF394688 the whole document	1,4-11, 14,15, 20,21
X	- & MARKOVA SVETLANA V ET AL: "Obelin from the bioluminescent marine hydroid Obelia geniculata: Cloning, expression, and comparison of some properties with those of other Ca ²⁺ -regulated photoproteins" BIOCHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. EASTON, PA, US, vol. 41, no. 7, 19 February 2002 (2002-02-19), pages 2227-2236, XP002232863 ISSN: 0006-2960 the whole document	1,4-11, 14,15, 20,21
X	----- WO 03/006497 A (COURJEAN OLIVIER ARSENE ; LAMBOLEZ BERTRAND (FR); TRICOIRE LUDOVIC ERI) 23 January 2003 (2003-01-23) cited in the application abstract page 8, line 5 - line 6 claims 8,13,15-18	1,4-11, 14,15, 20,21
A	----- WO 91/01305 A (UNIV WALES MEDICINE) 7 February 1991 (1991-02-07) abstract page 7, line 16 - line 20 page 8, line 9 - line 26	1,2, 4-11, 13-21
A	----- DUNSTAN S L ET AL: "Cloning and expression of the bioluminescent photoprotein pholasin from the bivalve mollusc Pholas dactylus." THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. 31 MAR 2000, vol. 275, no. 13, 31 March 2000 (2000-03-31), pages 9403-9409, XP002305955 ISSN: 0021-9258 abstract page 9407, right-hand column, line 14 - line 16 -----	1,2, 4-11, 13-21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2004/009843

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see suppl. sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1, 2, 11, 13, 16-19 complete 4-10, 14, 15, 20, 21 in part

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of Box III

The International Searching Authority has determined that this international application contains multiple (groups of) inventions, as follows:

Invention 1: Claims 1, 2, 11, 13 and 16-19 (in full)
Claims 4-10, 14, 15, 20 and 21 (in part)

Nucleic acid containing a sequence as per SEQ ID No. 1 or No. 4 and encoding a polypeptide with the amino acid sequence of SEQ ID No. 2 or a peptide with the sequence of SEQ ID No. 3; recombinant DNA or RNA vectors containing said nucleic acid; organisms containing said vectors; oligonucleotides with more than 10 successive nucleotides of the aforementioned nucleic acid; the aforementioned polypeptide *per se*; method for expressing or cleaning/isolating said polypeptide; peptides with more than 5 successive amino acids of the polypeptide; use of the aforementioned nucleic acid as a marker gene or reporter gene and of the polypeptide as a marker or reporter; use of the aforementioned nucleic acid as a signal sequence or leader sequence and of the peptide as a signal peptide or leader peptide.

Invention 2: Claims 3 and 12 (in full)
Claims 4-10, 14, 15, 20 and 21 (in part)

The same as invention 1, but relating to a nucleic acid molecule containing a sequence as per SEQ ID No. 5 and encoding a polypeptide with the amino acid sequence of SEQ ID No. 6.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2004/009843

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
WO 03006497	A	23-01-2003	FR	2827292 A1		17-01-2003
			CA	2455542 A1		23-01-2003
			EP	1404711 A2		07-04-2004
			WO	03006497 A2		23-01-2003

WO 9101305	A	07-02-1991	AT	208792 T		15-11-2001
			AU	6054590 A		22-02-1991
			CA	2064766 A1		23-01-1991
			DE	69033855 D1		20-12-2001
			DE	69033855 T2		11-07-2002
			DK	484369 T3		11-03-2002
			EP	1097992 A2		09-05-2001
			EP	0484369 A1		13-05-1992
			ES	2167307 T3		16-05-2002
			WO	9101305 A1		07-02-1991
			JP	5501862 T		08-04-1993
			JP	3375337 B2		10-02-2003
			JP	2003102491 A		08-04-2003
			US	2002151014 A1		17-10-2002
			US	6440665 B1		27-08-2002
			US	5683888 A		04-11-1997
			US	6492500 B1		10-12-2002

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2004/009843

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C07K14/435 C12N5/10 C12N15/12 C12Q1/68 G01N33/50
G01N33/533

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchiertes Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, EMBL, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>DATABASE UniProt 1. Oktober 1994 (1994-10-01), INOUE S. ET AL.: "Clytin precursor (Phialidin)" XP002300448 Database accession no. Q08121 das ganze Dokument</p>	<p>1,4-11, 14,15, 20,21</p>
X	<p>-& INOUE S ET AL: "CLONING AND SEQUENCE ANALYSIS OF CDNA FOR THE CA2+-ACTIVATED PHOTOPROTEIN, CLYTIN" FEBS LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, Bd. 315, Nr. 3, Januar 1993 (1993-01), Seiten 343-346, XP001180448 ISSN: 0014-5793 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument</p> <p style="text-align: center;">----- -/-</p>	<p>1,4-11, 14,15, 20,21</p>

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
 - "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
 - "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
 - "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
 - "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

17. November 2004

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

07 FEB 2005

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Huse, I

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2004/009843

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DATABASE EMBL 10. März 2002 (2002-03-10), MARKOVA S. V. ET AL.: "Obelia geniculata" apoobelin mRNA, complete cds" XP002305433 Database accession no. AF394688 das ganze Dokument	1,4-11, 14,15, 20,21
X	-& MARKOVA SVETLANA V ET AL: "Obelin from the bioluminescent marine hydroid Obelia geniculata: Cloning, expression, and comparison of some properties with those of other Ca ²⁺ -regulated photoproteins" BIOCHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. EASTON, PA, US, Bd. 41, Nr. 7, 19. Februar 2002 (2002-02-19), Seiten 2227-2236, XP002232863 ISSN: 0006-2960 das ganze Dokument	1,4-11, 14,15, 20,21
X	----- WO 03/006497 A (COURJEAN OLIVIER ARSENE ; LAMBOLEZ BERTRAND (FR); TRICOIRE LUDOVIC ERI) 23. Januar 2003 (2003-01-23) in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung Seite 8, Zeile 5 - Zeile 6 Ansprüche 8,13,15-18	1,4-11, 14,15, 20,21
A	----- WO 91/01305 A (UNIV WALES MEDICINE) 7. Februar 1991 (1991-02-07) Zusammenfassung Seite 7, Zeile 16 - Zeile 20 Seite 8, Zeile 9 - Zeile 26	1,2, 4-11, 13-21
A	----- DUNSTAN S L ET AL: "Cloning and expression of the bioluminescent photoprotein pholasin from the bivalve mollusc Pholas dactylus." THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. 31 MAR 2000, Bd. 275, Nr. 13, 31. März 2000 (2000-03-31), Seiten 9403-9409, XP002305955 ISSN: 0021-9258 Zusammenfassung Seite 9407, rechte Spalte, Zeile 14 - Zeile 16 -----	1,2, 4-11, 13-21

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2004/009843

Feld II Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld III Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☒ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:
1, 2, 11, 13, 16-19 vollständig 4-10, 14, 15, 20, 21 teilweise

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, dass diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

Erfindung 1: Ansprüche 1, 2, 11, 13, 16-19 (vollständig);
Ansprüche: 4-10, 14, 15, 20, 21 (teilweise)

Nukleinsäure, welche eine Sequenz gemäss SEQ ID No. 1 bzw. 4 beinhaltet und welche ein Polypeptid mit der Aminosäuresequenz gemäss SEQ ID No. 2 bzw. ein Peptid mit der Sequenz gemäss SEQ ID No. 3 kodiert; besagte Nukleinsäure enthaltende rekombinante DNA oder RNA Vektoren; besagte Vektoren enthaltende Organismen; Oligonukleotide mit mehr als 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden der obigen Nukleinsäure; das oben genannte Polypeptid an sich; Verfahren zur Expression bzw. Aufreinigung/ Isolierung besagten Polypeptids; Peptide mit mehr als 5 aufeinanderfolgenden Aminosäuren des Polypeptids; Verwendung obiger Nukleinsäure als Marker- oder Reportergen bzw. des Polypeptids als Marker oder Reporter; Verwendung obiger Nukleinsäure als Signal-/ Leadersequenz bzw. des Peptids als Signal-/ Leaderpeptid.

Erfindung 2: Ansprüche 3, 12 (vollständig); Ansprüche 4-10, 14, 15, 20, 21 (teilweise)

Dasselbe wie Erfindung 1, jedoch bezogen auf ein Nukleinsäuremolekül, welches eine Sequenz gemäss SEQ ID No. 5 beinhaltet und ein Polypeptid mit der Aminosäuresequenz gemäss SEQ ID No. 6 kodiert.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/009843

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 03006497	A	23-01-2003	FR	2827292 A1	17-01-2003
			CA	2455542 A1	23-01-2003
			EP	1404711 A2	07-04-2004
			WO	03006497 A2	23-01-2003

WO 9101305	A	07-02-1991	AT	208792 T	15-11-2001
			AU	6054590 A	22-02-1991
			CA	2064766 A1	23-01-1991
			DE	69033855 D1	20-12-2001
			DE	69033855 T2	11-07-2002
			DK	484369 T3	11-03-2002
			EP	1097992 A2	09-05-2001
			EP	0484369 A1	13-05-1992
			ES	2167307 T3	16-05-2002
			WO	9101305 A1	07-02-1991
			JP	5501862 T	08-04-1993
			JP	3375337 B2	10-02-2003
			JP	2003102491 A	08-04-2003
			US	2002151014 A1	17-10-2002
			US	6440665 B1	27-08-2002
			US	5683888 A	04-11-1997
			US	6492500 B1	10-12-2002

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.